

ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России
Кафедра химии

Молекулярные основы рецепции и
внутриклеточной сигнализации: общие
принципы передачи сигналов

Д.б.н. Сгибнев А.В.

Фундаментальные принципы передачи сигналов

Суть: одна клетка синтезирует и выделяет химический сигнал, другая клетка принимает его с помощью белков-рецепторов. При контакте рецептора с сигнальным веществом в принимающей клетке запускается та или иная химическая реакция.



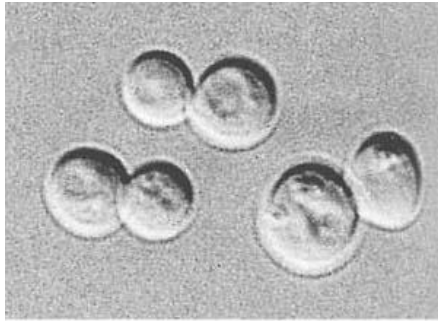
Для чего нужна межклеточная сигнализация?

Обмениваясь сигналами, клетки могут синхронизировать друг с другом биохимические процессы и совместно реализовывать сложные функции. Без этой способности существование многоклеточных организмов было бы невозможно.

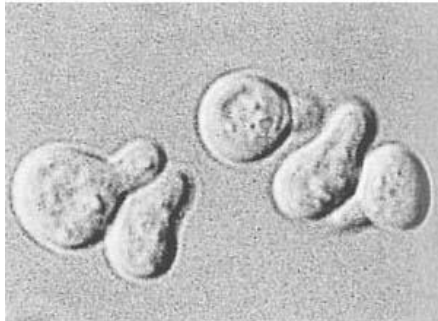
nmings.

Клеточная сигнализация определяет возможность развития организма

Фундаментальные принципы передачи сигналов на примере *S. cerevisiae*



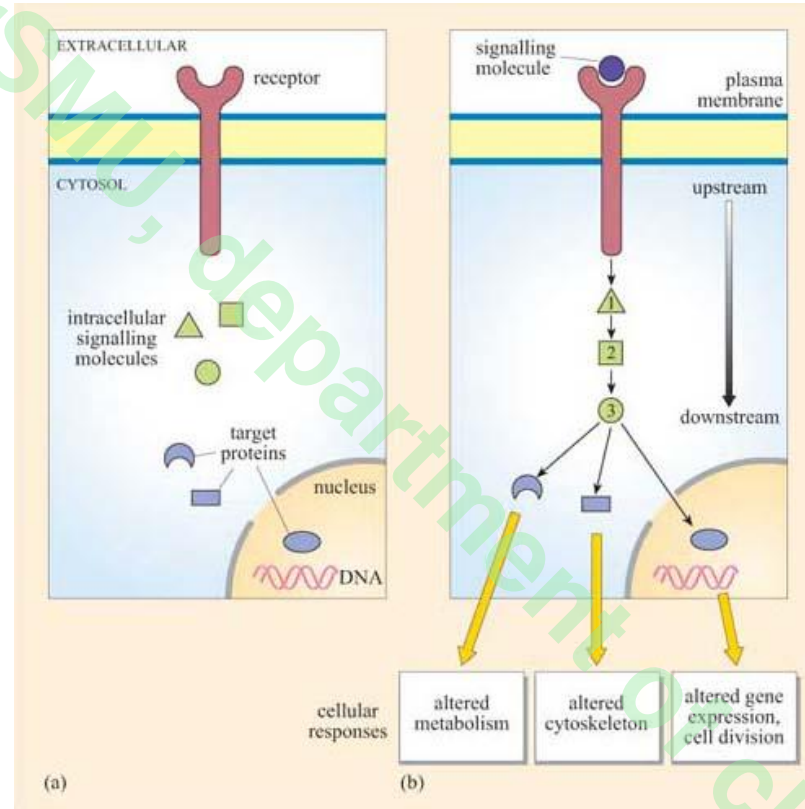
(a)



(b)

(a) Покоящиеся клетки.

(б) Дрожжевые клетки реагируют на «фактор спаривания» образованием клеточных выступов в направлении клетки, которая высвобождает фактор спаривания



(a)

(b)

Модель сигнального пути

(a) Внутриклеточные сигнальные молекулы (**зеленый**) и белки-мишени (**синий**) присутствуют, но сигнальный путь не активирован.

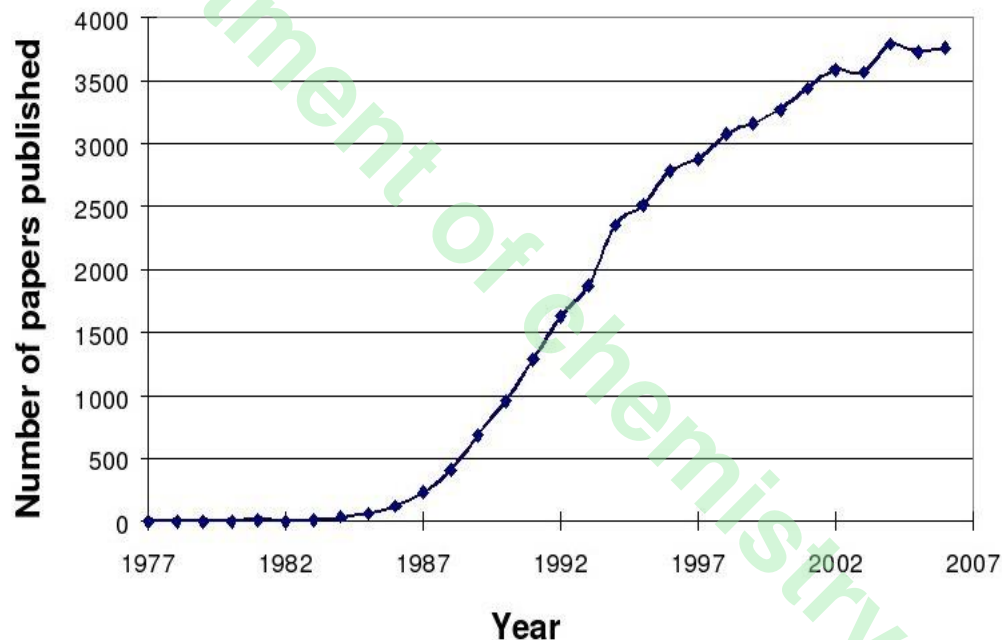
(b) Внеклеточная сигнальная молекула связалась с рецептором и активировала серию внутриклеточных сигнальных молекул, которые активируют целевые молекулы.

Эта модель передачи сигналов подходит для большинства внутриклеточных сигнальных путей, и часто сами сигнальные молекулы являются высококонсервативными. Например, существует высокая степень гомологии между основными белками сигнального пути «фактора спаривания» дрожжей и сигнального пути MAP-киназы.

Все типы клеток **получают регуляторные сигналы** из окружающей среды, **декодируют** их и **передают** во внутриклеточное пространство к соответствующим молекулам-мишеням.

Сигнальная трансдукция (signal transduction) – передача регуляторного сигнала внутри клетки. Происходит с помощью различных сигнальных путей с участием молекул мессенджеров и белков-посредников.

Термин «signal transduction» появился в научных журналах в 1972 г.

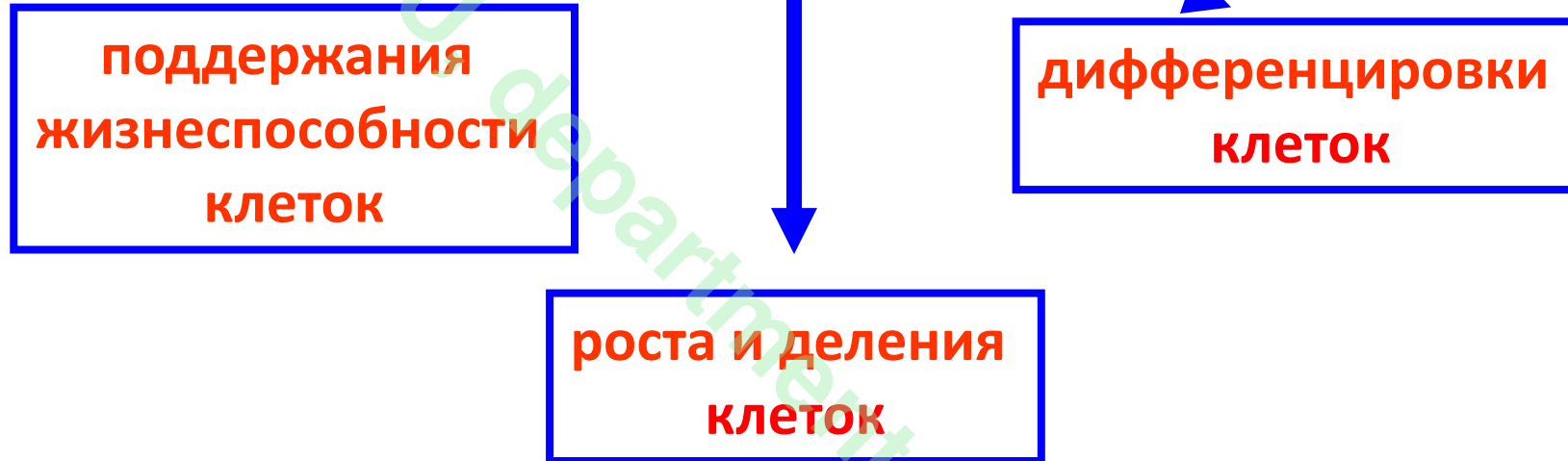


Внутриклеточные эффекторные механизмы едины:

- Активация/ингибирование внутриклеточных ферментов;
- Открытие/закрытие ионных каналов;
- Активация взаимодействия сократительных белков;
- Экспрессия/супрессия определенных генов, контролирующих:
 - образование белков-ферментов, переносчиков, рецепторов;
 - клеточный цикл (пролиферация, созревание, дифференцировка, апоптоз).

Сигнальные молекулы -

эндогенные молекулы, управляющие метаболизмом клеток: несут информацию для:



Прекращение внешней сигнализации (либо потеря клеткой способности воспринимать внешние сигналы) приводит к запуску программируемой гибели такой клетки (**апоптоз**).

Терминология

Медиатор (сигнальная молекула), мессенджер (от англ. – messenger – посредник) – молекула, адресно передающая информацию от клетки к клетке (или внутри клетки)

Это не равнозначные синонимы!

Лиганд

любое органическое химическое соединение, образующее комплекс с какой-либо биомолекулой (чаще с белком, например клеточным рецептором, иногда с ДНК) что вызывает клеточный ответ:

- 1) биохимический,
- 2) физиологический или
- 3) фармакологический

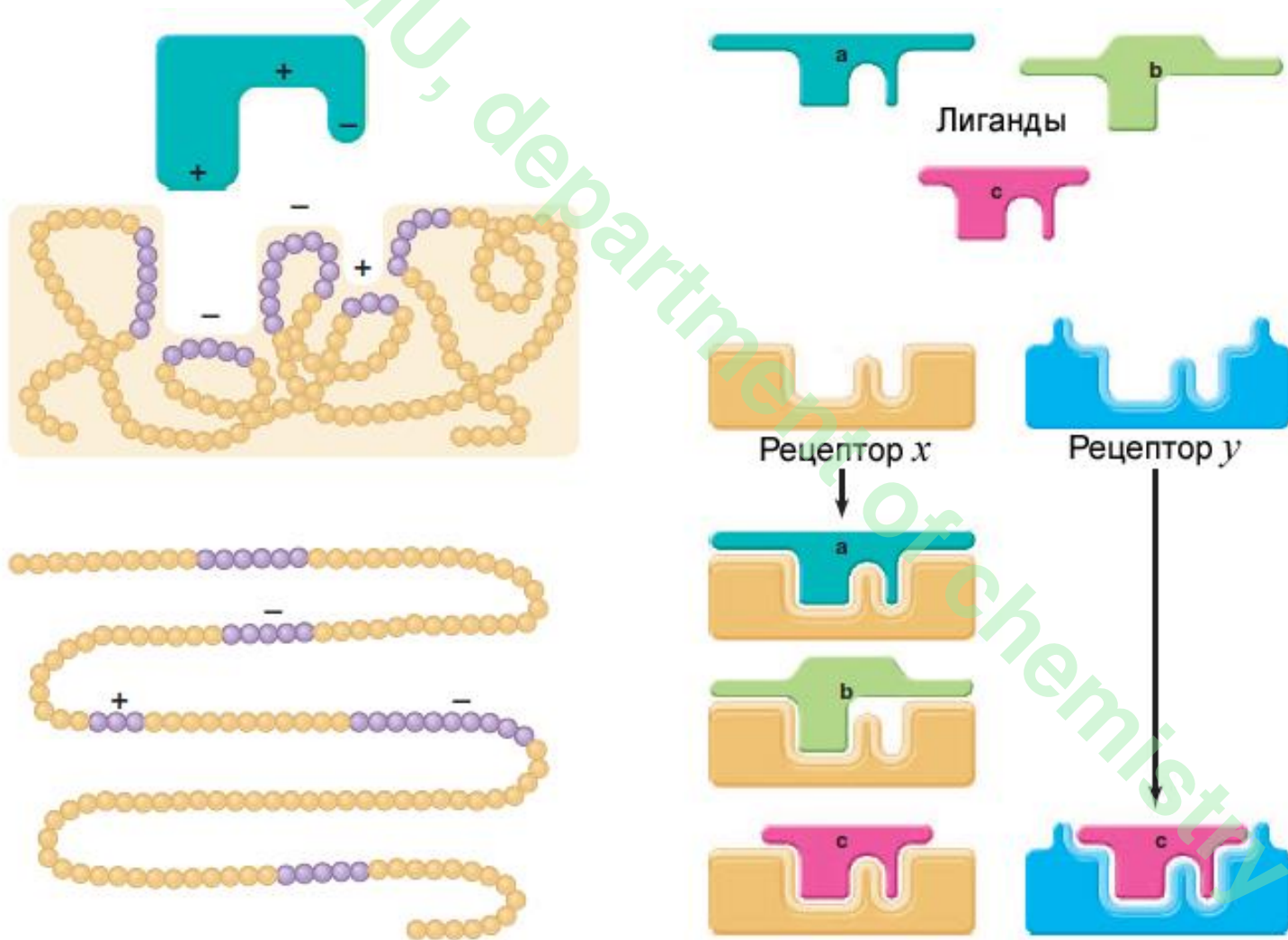
Первичный мессенджер

от греч. ὁρμάω (лат. harmao) – возбуждаю биологически активные вещества органической природы, вырабатываемые в специализированных клетках желёз внутренней секреции, поступающие в кровь, связывающиеся с рецепторами клеток-мишеней и оказывающие регулирующее влияние на обмен веществ и физиологические функции.

Вторичный мессенджер (вторичный посредник)

(secondary mediator, second messenger) – физиологически активная регуляторная молекула, образующаяся в цитоплазме клеток в ответ на взаимодействие сигнальной молекулы (гормона, нейромедиатора и др.) и участвует в передаче и усилении сигнала внутри клетки.

- **Лиганд** – это химическое соединение, обладающее способностью связываться с рецептором и изменять его состояние, приводя к формированию физиологической реакции.



Лигандом
может быть

нейромедиатор

Амины,
Белки,
NO, CO

гормон

Дистантного действия

Гипофизарные,
Панкреатические
Натрийуретические пептиды,
Гормоны печени, почек
Адипокины

Белки

Липиды

Локального действия

(аутоактиды)

Простагландины,
Тромбоксаны,
Лейкотриены,
Фактор активации тромбоцитов

**Стероиды,
Ретиноиды,
Тироксин → T₃**

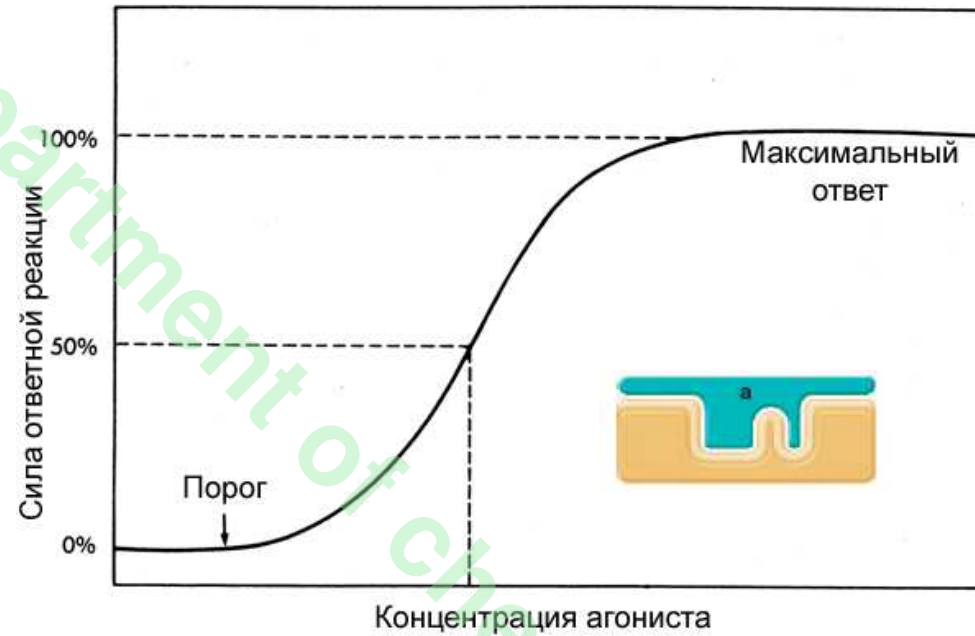
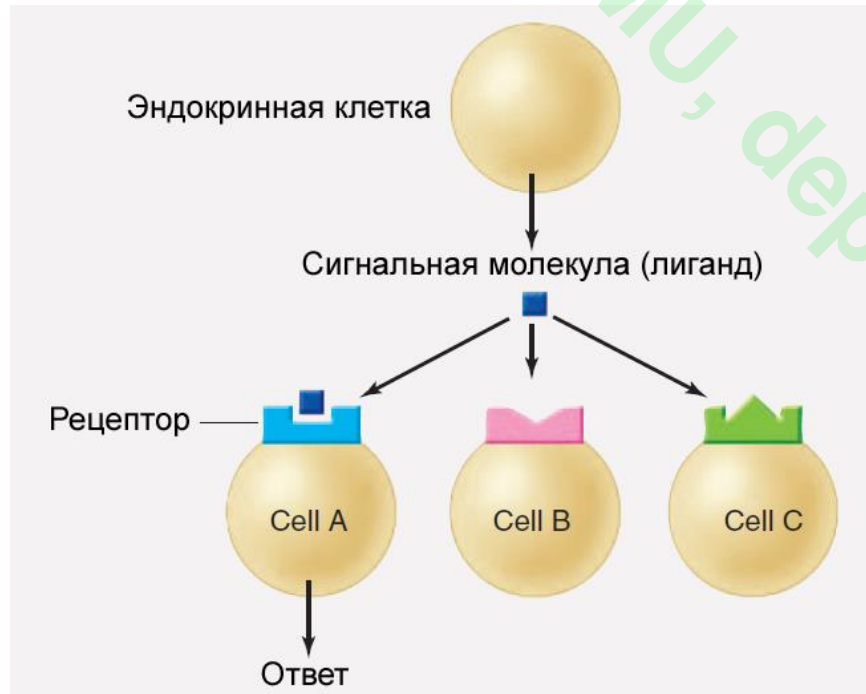
ксенобиотик

естественное вещество,
биологического
происхождения, не
являющееся специфичным
для данного вида
метаболитом поступающее
с пищей или используемое
как фармакологическое
средство, либо пищевой
или промышленный
продукт

искусственно синтезированное
вещество, используемое как
фармакологическое средство,
либо пищевой или
промышленный продукт

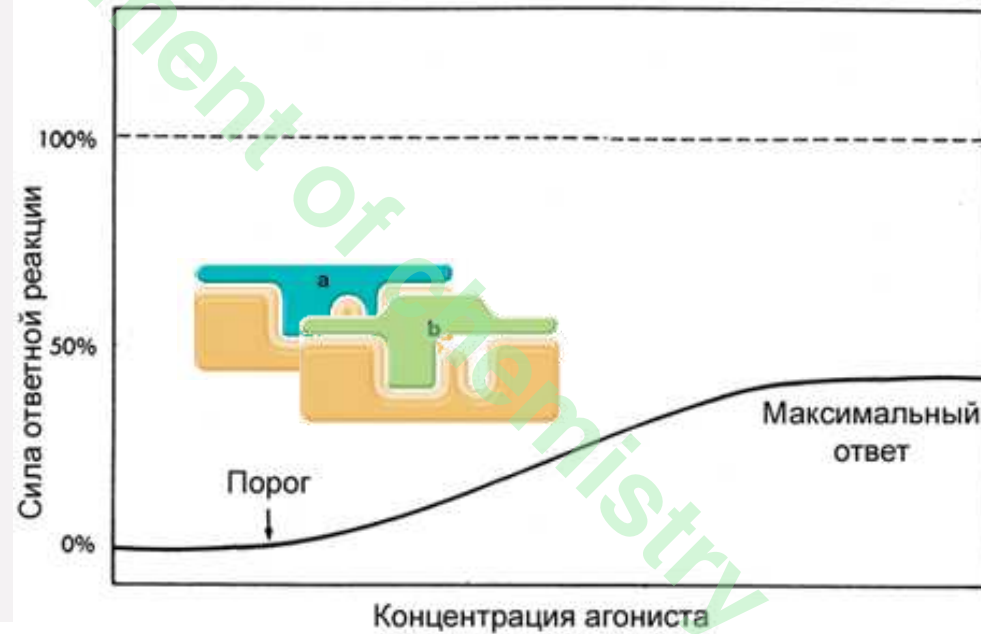
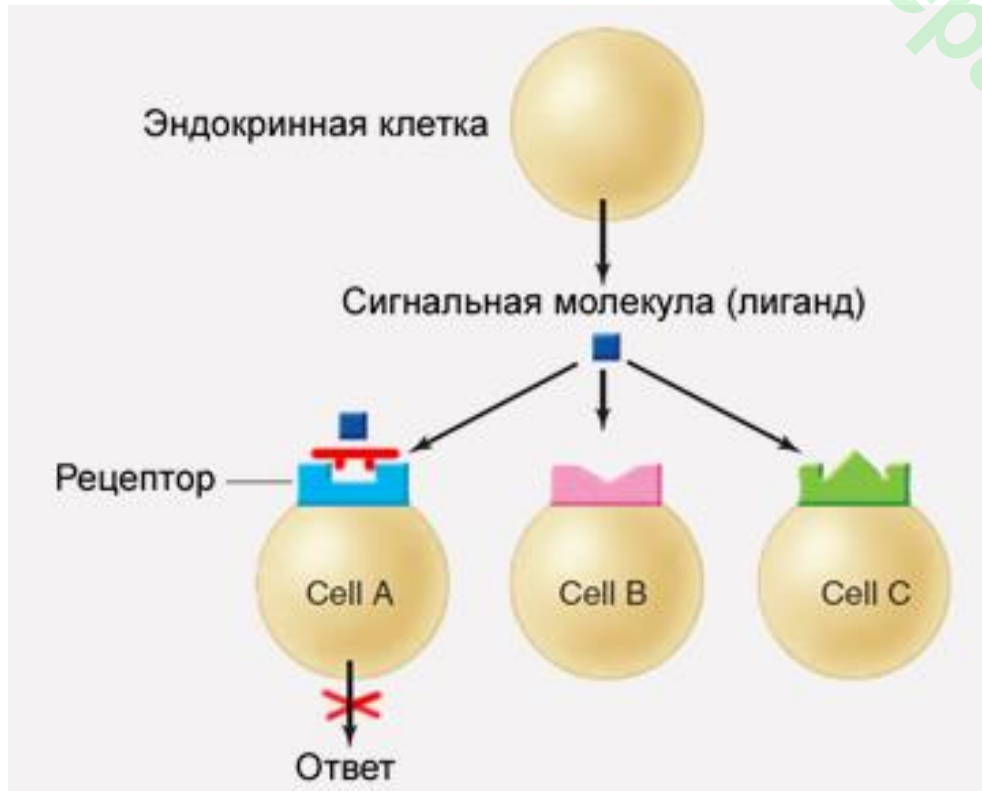
Сахара?

- **Агонист** (стимулятор) – это лиганд, который при взаимодействии с рецептором вызывает ответную реакцию или увеличивает ее силу.



- **Антагонист (блокатор)** – это лиганд, который при взаимодействии с рецептором блокирует его, предотвращая активацию рецептора агонистом.

**АНТАГОНИСТ СВЯЗЫВАЕТСЯ С РЕЦЕПТОРОМ,
НО НЕ АКТИВИРУЕТ ЕГО!**



Лиганды

Гидрофильные

- **Производные аминокислот:**
 - Катехоламины (Адр., НА)
 - Мелатонин
 - Гистамин
- **Белково-пептидной природы:**
 - Гормоны нейрогипофиза (окситоцин, вазопрессин)
 - Ангиотензин II
 - Гормоны гипоталамуса
 - Гормоны гипофиза (АКТГ, СТГ)
 - Гормоны поджелудочной железы (инсулин, глюкагон)

Гидрофобные

- **Производные аминокислот:**
 - Тиреоидные гормоны
- **Производные холестерина:**
 - Кортикостероиды
 - Половые гормоны
 - $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$
- **Производные арахидоновой кислоты:**
 - Эйкозаноиды (простагландины, тромбаксаны, лейкотриены)

Регуляторные сигналы поступают в двух направлениях:

1. Снаружи → внутрь.

Метаболизм каждого типа клеток определяет комплект рецепторов, воспринимающих сигналы, предназначенные именно этому типу клеток (в соответствии с её функциональной специализацией).

2. Изнутри → к наружи.

Определенные типы клеток сами секретируют сигнальные молекулы. Эти молекулы действуют на:

- близлежащие клетки (цитокины, паракринный эффект);
- на большие расстояния (гормоны, эндокринный эффект).

Внеклеточные сигнальные молекулы (**первичные мессенджеры**) действуют как на коротких, так и на длинных дистанциях:

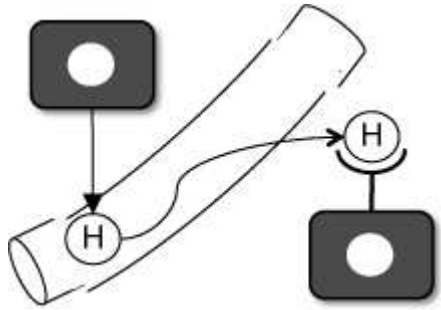
Короткие дистанции:

- **прямой контакт** клеточных мембран;
- **паракринная сигнализация**: одни клетки секретируют сигнальные молекулы, которые действует на соседние однотипные клетки (сигнальные молекулы не поступают в кровоток);
- **аутокринная сигнализация** – передача сигнальной молекулы самой себе - посредством рецепторов к этой молекуле, которые клетка несёт на своей собственной поверхности.

Длинные дистанции:

- **синаптическая передача электрического сигнала** вдоль аксона с высвобождением в синапсе нейромедиатора/нейротрансммиттера;
- **эндокринная сигнализация**: химический сигнал (лиганд) – синтезируется в эндокринных железах и секретируется в кровоток, с помощью которого лиганд доставляется к клеткам-мишеням.

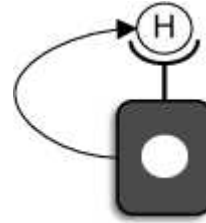
Информация между клетками может передаваться многими способами



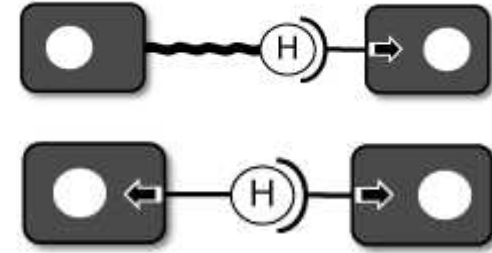
А) эндокринный



(Б) паракринный



(В) аутокринный



(Г) юкстакринный

(А) сигнальная молекула (СМ) производится в одной части организма, действует в другой.

(Б) СМ остается в той же ткани, где образуется, и достигает клеток-мишеней путем диффузии.

(В) СМ действует на ту же клетку, в которой образовалась (такая регуляция является частью положительной или отрицательной обратной связи);

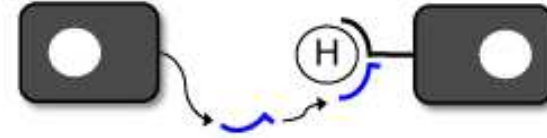
(Г) СМ на поверхности клетки воздействует на соседние клетки, несущие рецепторы этой молекулы.

СМ синтезируется как мембран-связанный предшественник, после отщепления сигнального пептида остается на мембране и может сохранять биологическую активность. Действие таких СМ ограничено длиной их якоря. Они могут действовать однонаправленно (эпидермальный фактор роста EGF, трансформирующий фактор роста TGF α , фактор некроза опухолей TNF α) и двунаправленно: якорь мембрансвязанной СМ может иметь внутриклеточный домен, сопряженный с сигнальными внутри клетки (эфриновые лиганды), которые активируют как прямую сигнализацию в соседней клетке с эфриновыми рецепторами, так и обратную сигнализацию в клетке, на мембране которой они расположены. Эфрины (лиганды эфрина или белки, взаимодействующие с рецепторами семейства Eph - подсемейство рецепторных протеин-тирозинкиназ

Информация между клетками может передаваться многими способами



(Д) интракринный

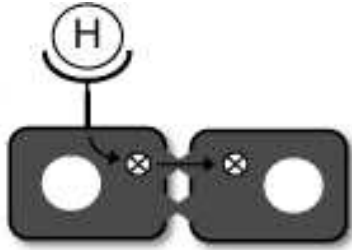


(Е) транссигнализация

(Д) синтез СМ и связывание с рецептором происходят внутри клетки (ядерные рецепторы липидных СМ, например, X-рецептор гепатоцитов связывает холестерин-подобные стеролы, синтез которых он же и регулирует. 3 варианта механизма (эндогенный предшественник синтезируется где-либо, конвертируется в активную форму на месте действия). 1 - тиреоидные гормоны, тироксин синтезируются в ЩЖ, преобразуются в 3И-тиронин периферическими ферментами; половые стероиды: около 40% андрогенов у мужчин и 75% эстрогенов у женщин в постменструальном периоде образуются в тканях-мишенях из предшественников, синтезируемых в надпочечниках. 3 – пептидные гормоны, (трансформирующий фактор роста (TGF β)) секретируются неактивными и активируются в зоне действия ограниченным протеолизом.

(Е) одна клетка передает другой субъединицу рецептора, которая связывается с базовой субъединицей и придает высокую аффинность рецепторному комплексу клетки-хозяина. Например, рецептор интерлейкина-6 (IL-6) состоит из двух частей – гликопротеина 130-кДа и собственно рецептора (IL-6R), которые имеют низкое сродство друг к другу и экспрессируются конститутивно в таких количествах, что активный комплекс практически не образуется. При воспалении активированные лейкоциты слущивают с поверхности IL-6R, который затем взаимодействует с gp130 и образует активный рецептор.

Информация между клетками может передаваться многими способами



(Ж) крипторинный

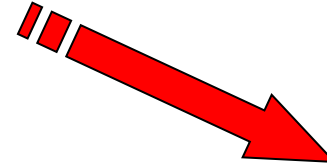
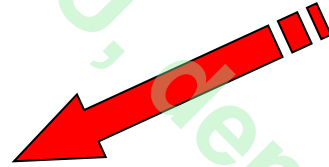


(З) нейрокринный

(Ж) секреция СМ в малое закрытое пространство, например, между эпителиальными клетками коры тимуса (вилочковой железы) и Т-лимфоцитами. В этом случае диффузионные барьеры отсутствуют, а избирательность достигается наличием рецепторов к этому гормону на клетках-мишенях. Или перенос вторичных посредников (циклические нуклеотиды, инозитолтрифосфат или Ca^{2+} через щелевые контакты между соседними клетками.

(З) Разновидностью крипторинной системы является нейрокринная регуляция, осуществляется с использованием химических сигнальных молекул и синаптической передачи. Но нейрокринная сигнализация — это частный случай эндокринной регуляции, когда передающая клетка является нейроном.

Сигнальные молекулы – мессенджеры
(от англ. «messenger» - посланник)



Первичные мессенджеры:
молекулы, несущие регуляторный
сигнал для клетки из внешней
среды.
**Действуют во внеклеточном
пространстве.**

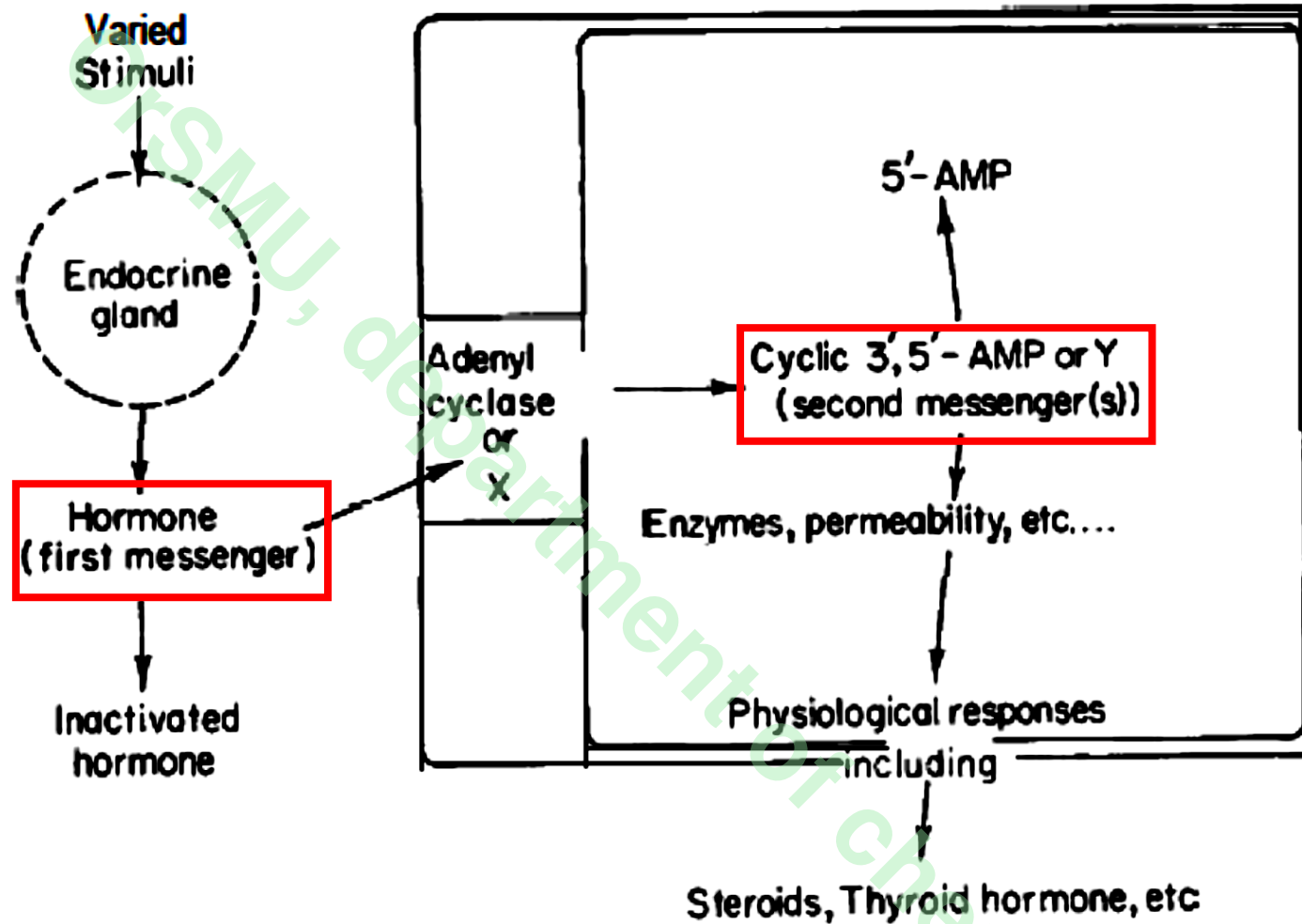
Вторичные мессенджеры:
молекулы, которые передают
регуляторный (информационный)
сигнал от первичных
мессенджеров к
внутриклеточным молекулам-
мишеням (исполнительным
молекулам).
Действуют внутри клетки.



Эрл Уилбур Сазерленд
(Earl Wilbur Sutherland)
1915-1974

Концепция первичных и вторичных мессенджеров была сформулирована в первой половине 60-х годов XX в. в ходе изучения молекулярных механизмов передачи регуляторного сигнала от глюкагона или адреналина на внутриклеточный ферментативный каскад *гликогенфосфорилазы* печени и мышц. **Нобелевская премия по физиологии и медицине (1971 г.) «... за открытия, касающиеся механизмов действия гормонов».**

Э. Сазерленд открыл «посредническую» роль цАМФ во внутриклеточной передаче сигнала от рецепторов глюкагона и адреналина к гликогенфосфорилазе: цАМФ активирует протеинкиназу, которая переводит фермент в активную форму.



Схема, иллюстрирующая концепцию первичного и вторичного мессенджеров. (Из статьи [Sutherland E. W. & Robison G. A. The role of cyclic-3',5'-AMP in responses to catecholamines and other hormones. *Pharmac. Rev.*, 1966, 18, 145-161\).](#)

Первичные мессенджеры – группа сигнальных биомолекул (лигандов), имеющих различное химическое строение, действующие на клетку путем высокоаффинного связывания со специфическими рецепторами (поверхностными или внутриклеточными) и способные активировать механизм передачи регуляторного сигнала внутрь клетки.

Основные группы первичных мессенджеров:

1. Гормоны. Синтезируются специализированными органами или клетками, отдаленными от клеток-мишеней. Транспортируются от места синтеза к местам действия по крови. Действуют посредством высокоаффинного связывания со специфическими рецепторами.

2. Факторы роста. Несут митогенный сигнал - стимулируют митоз и деление клеток. Для факторов роста у клеток есть специфические рецепторы. Факторы роста способны инициировать апоптоз и дифференцировку клеток. Действуют, как правило, на небольшом расстоянии – на соседние клетки (паракринно).

В отличие от гормонов, эффекты факторов роста могут длиться несколько суток.

3. Цитокины (IL, IFN, TNF, CSF). Внеклеточные, сравнительно небольшой массы белки (10 – 30 кДа). Регулируют: функции клеток иммунной и гемopoэтической систем, переносят межклеточные сигналы в очаге воспаления, участвуют в эмбриональном развитии мно-гих тканей. Действуют, в основном, паракринно, но могут и эндокринно.

Основные группы первичных мессенджеров:

4. Нейромедиаторы (нейротрансмиттеры). Их выделение и связывание происходит внутри синаптической щели. Эффект медиатора (возбуждающий или тормозящий), определяется природой ионного канала, сопряженного с рецептором нейромедиатора.

5. Вазоактивные агенты. Гистамин, серотонин и брадикинина, а также эйкозаноиды: простагландины, тромбоксаны и лейкотриены. Все они служат для повышения проницаемости стенок сосудов в очаге воспаления для проникновения из кровотока лейкоцитов. Действуют паракринно и аутокринно.

Вторичные мессенджеры – малые гидрофильные (как правило) молекулы, быстро и в больших количествах синтезируются внутри клетки в ответ на активацию рецептора первичными мессенджерами.

Служат для внутриклеточной передачи и усиления сигнала. Действуют в течение короткого времени и инактивируются различными способами.

- Их концентрация строго контролируется гормонами, нейромедиаторами и другими внеклеточными сигналами.
- Они образуются из доступных субстратов и имеют короткий биохимический период полужизни.

Основные свойства вторичных мессенджеров:

- имеют относительно небольшую молекулярную массу, что позволяет мессенджеру быстро диффундировать по цитоплазме;
- способны быстро разрушаться (в соответствии со временем передачи сигнала), либо, как ионы Ca^{2+} , быстро откачиваться из цитоплазмы до исходной концентрации: 10^{-7} М.

Семейство вторичных мессенджеров

1. **цАМФ**. Синтезируется с участием аденилатциклазы из АТФ. Синтез происходит быстро, но непродолжительно. **цАМФ – аллостерический активатор цАМФ-зависимой протеинкиназы А (ПКА)**.

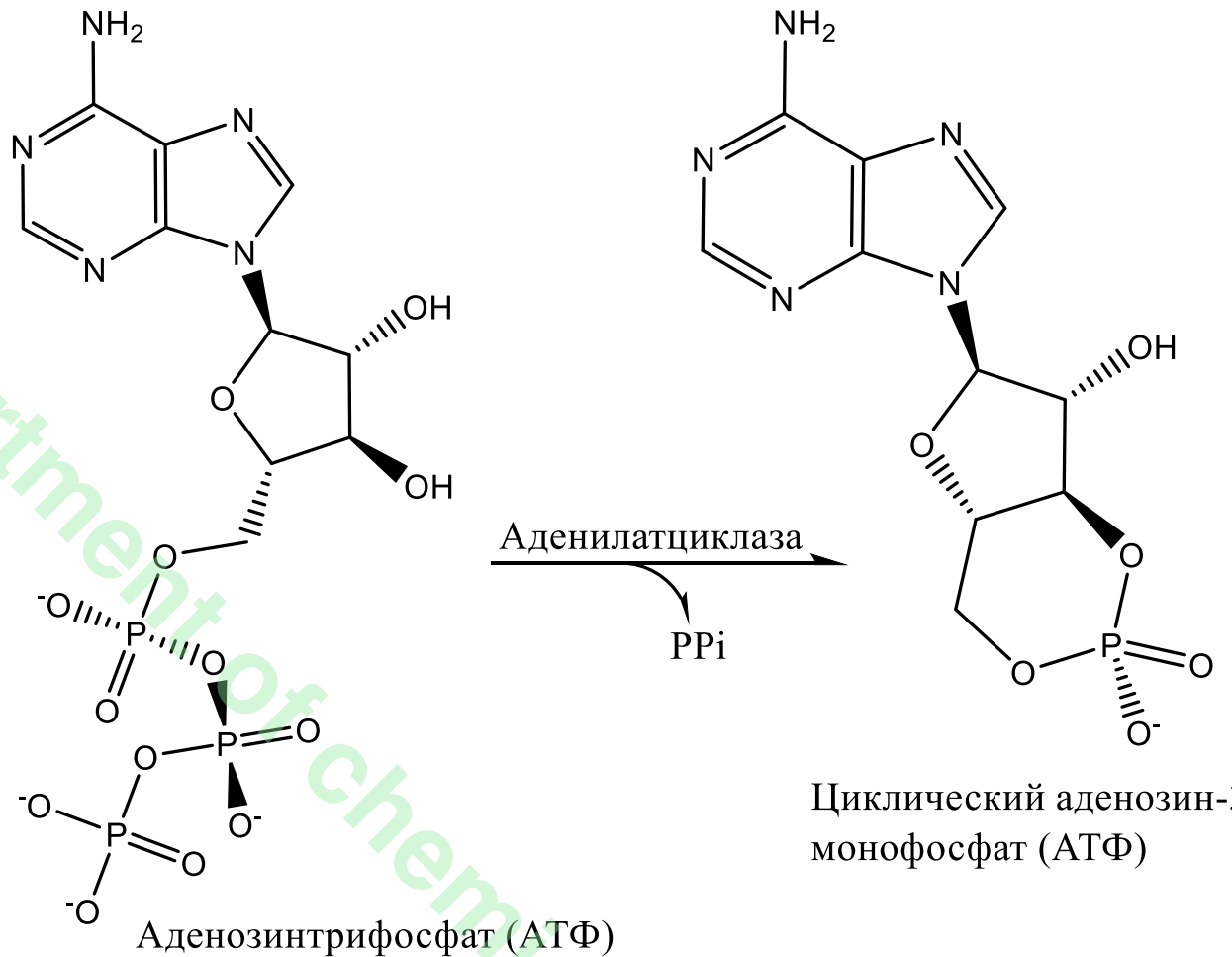
2. **цГМФ**. Синтезируется двумя разновидностями гуанилатциклазы - мембранной и растворимой в цитоплазме.

Мембранный фермент активируется предсердным натрийуретическим пептидом и кишечным пептидом – гуанилином. Активатор **растворимой формы фермента** – внутриклеточный оксид азота (NO).

Синтез циклического АМФ

цАМФ открыт при изучении стимуляции гликогенолиза в печени адреналином.

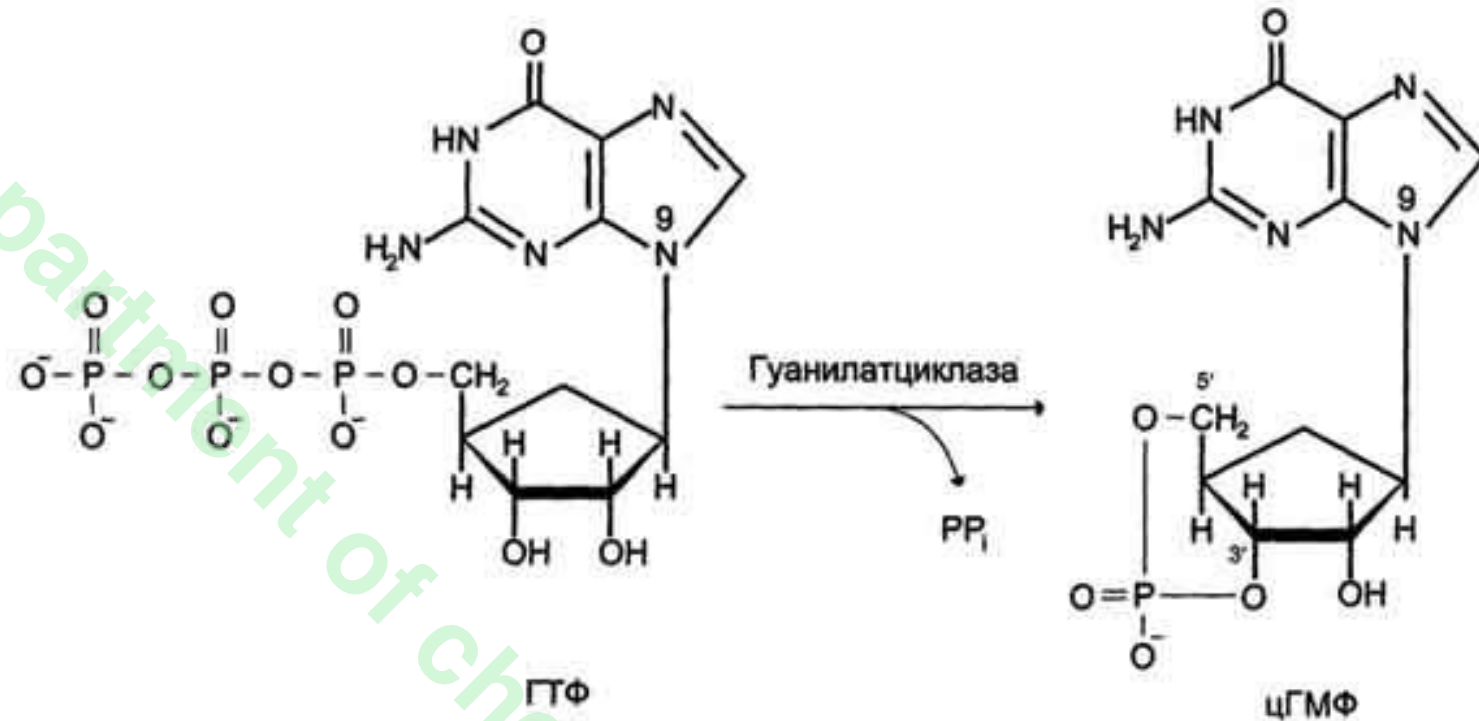
Циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) – первое соединение, которое Сазерленд назвал вторичным посредником.



Вторичный посредник (мессенджер) – циклический ГМФ (цГМФ)

Гормоны, использующие гуанилатциклазную систему:

- Предсердный натрийуретический гормон (пептид/фактор)
- Оксид азота (NO)



2 типа гуанилатциклазы:

- 3 мембранных
- 1 цитозольная

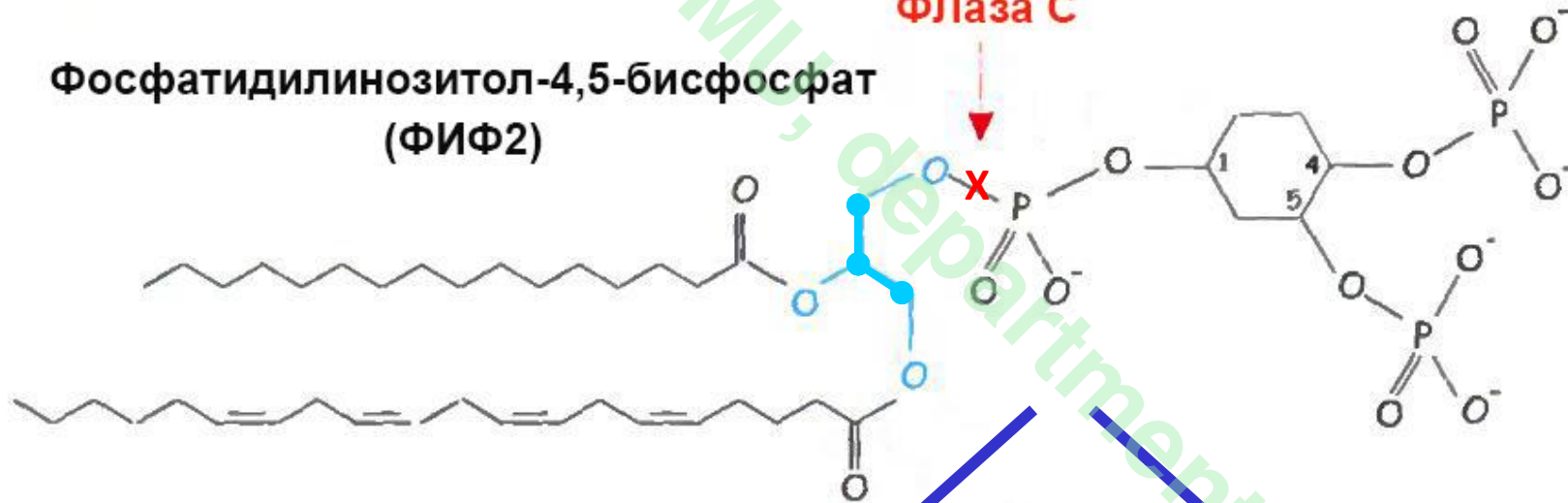
3. Диацилглицерол (ДАГ). Является первым продуктом действия фосфолипазы С (ФЛазы С) на мембранный (минорный) фосфолипид **фосфатидинозитол-2-фосфат (ФИФ2)**. Будучи гидрофобным, ДАГ остаётся во внутреннем слое плазматической мембраны. Там ДАГ взаимодействует с серин-треониновой протеинкиназой С (**ПКС**) и активирует её.

4. Инозитол-3-фосфат (ИФ3) – второй продукт, образуемый ФЛазой С. Является отщепленным головным концом **ФИФ2**. Благодаря отрицательному заряду, ИФ3 гидрофилен. Он диффундирует по цитоплазме и связывается с **ИФ3-активируемыми Ca^{2+} -каналами** мембран ЭР, чем стимулирует выход Ca^{2+} в цитоплазму. Увеличение $[\text{Ca}^{2+}]$ также необходимо для активации **ПКС**: неактивная **ПКС** локализована в цитоплазме. Присоединив Ca^{2+} , **ПКС** встраивается в цитоплазматическую мембрану, связываясь с заряженной головкой ФС.

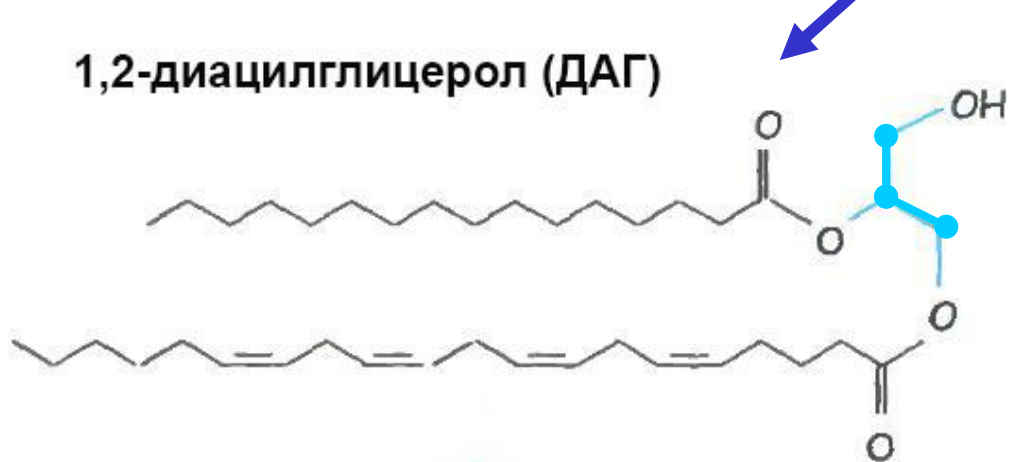
Образование диацилглицерола и инозитолтрифосфата с участием фосфолипазы С

ФЛАЗА С

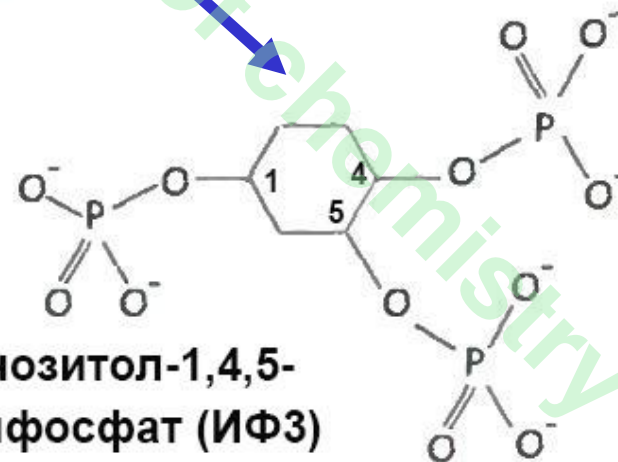
Фосфатидинозитол-4,5-бисфосфат (ФИФ2)



1,2-диацилглицерол (ДАГ)



ИНОЗИТОЛ-1,4,5-ТРИФОСФАТ (ИФ3)

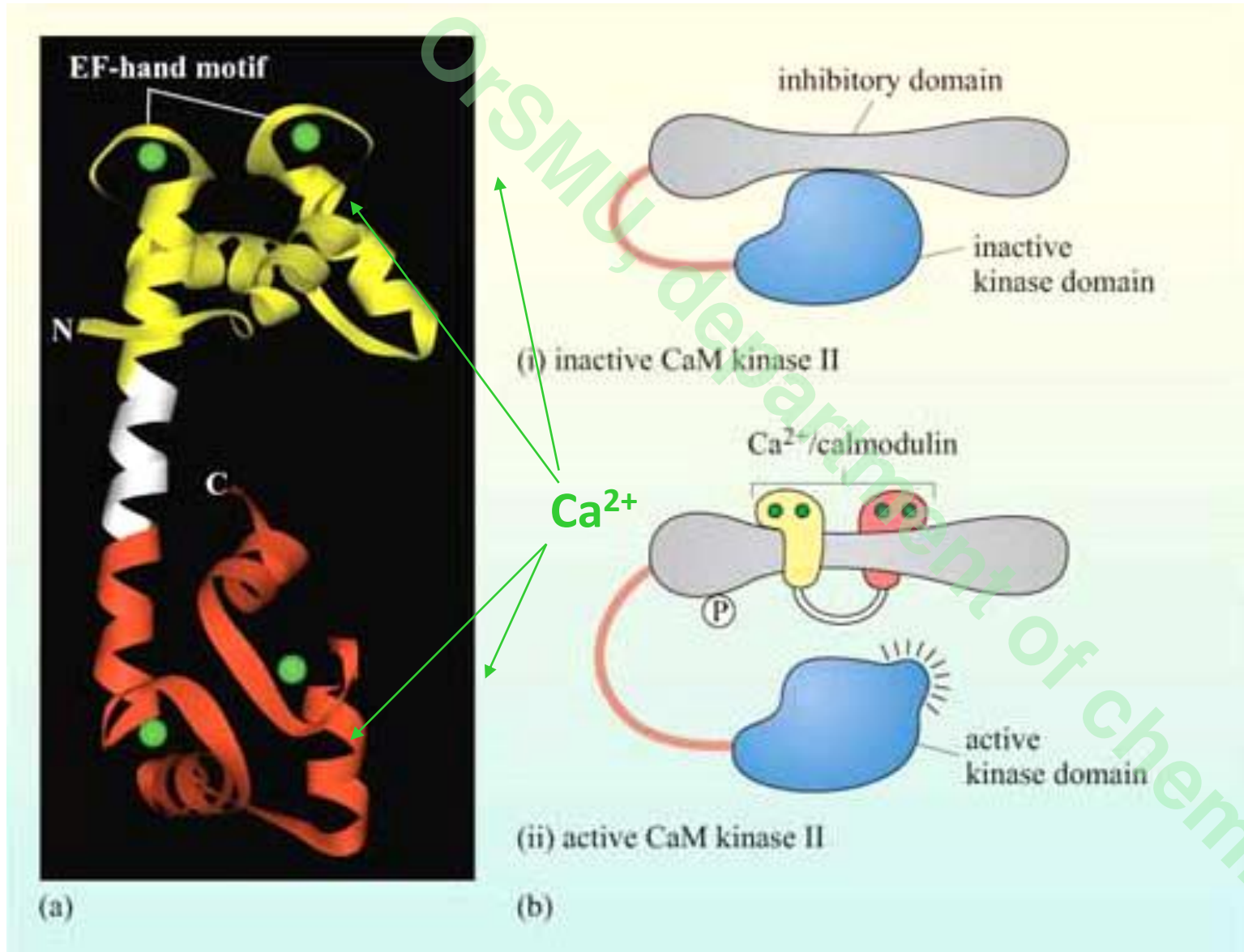


5. Ионы Ca^{2+} . В цитоплазме нестимулированной клетки $[\text{Ca}^{2+}] = 10^{-7}$ М. Во всех клетках повышение $[\text{Ca}^{2+}]$ до величины 10^{-6} М, происходит в ответ на стимуляцию рецепторов, сопряженных с G-белком, что приводит к образованию ИФЗ (сл. ранее).

Ионы Ca^{2+} действуют:

- а). прямо со специфическими сайтами в молекулах ПК, образующих определенное семейство (например: ПКС);
- б). опосредованно, с Ca^{2+} -связывающим белком **кальмодулином**. Комплекс Ca^{2+} -кальмодулин (связывает 4 иона Ca^{2+}) активирует ПК, принадлежащие к другому семейству: к **кальмодулин-зависимым ПК**.

Роль кальмодулина (CaM) в активации CaM-зависимой киназы



Фосфорилирование ингибиторного домена стабилизирует киназу в активном состоянии.

Полную инактивацию CaM-киназы вызывает **специфическая фосфатаза** - отщепляет фосфатную группу от ингибиторного домена.

6. Оксид азота (NO). Это газообразное соединение, являющееся свободным радикалом (имеет неспаренный электрон), что придает ему высокую реакционную способность: время жизни < 6-10 с. NO самая «маленькая» молекула среди известных вторичных мессенджеров.

NO синтезируется из аргинина с участием фермента **NO-синтазы**. Три изоформы NO-синтазы: две формы конститутивные: **eNOS** (эндотелий сосудов) и **nNOS** (нервная система) и одна форма – индуцибельная (**iNOS**).

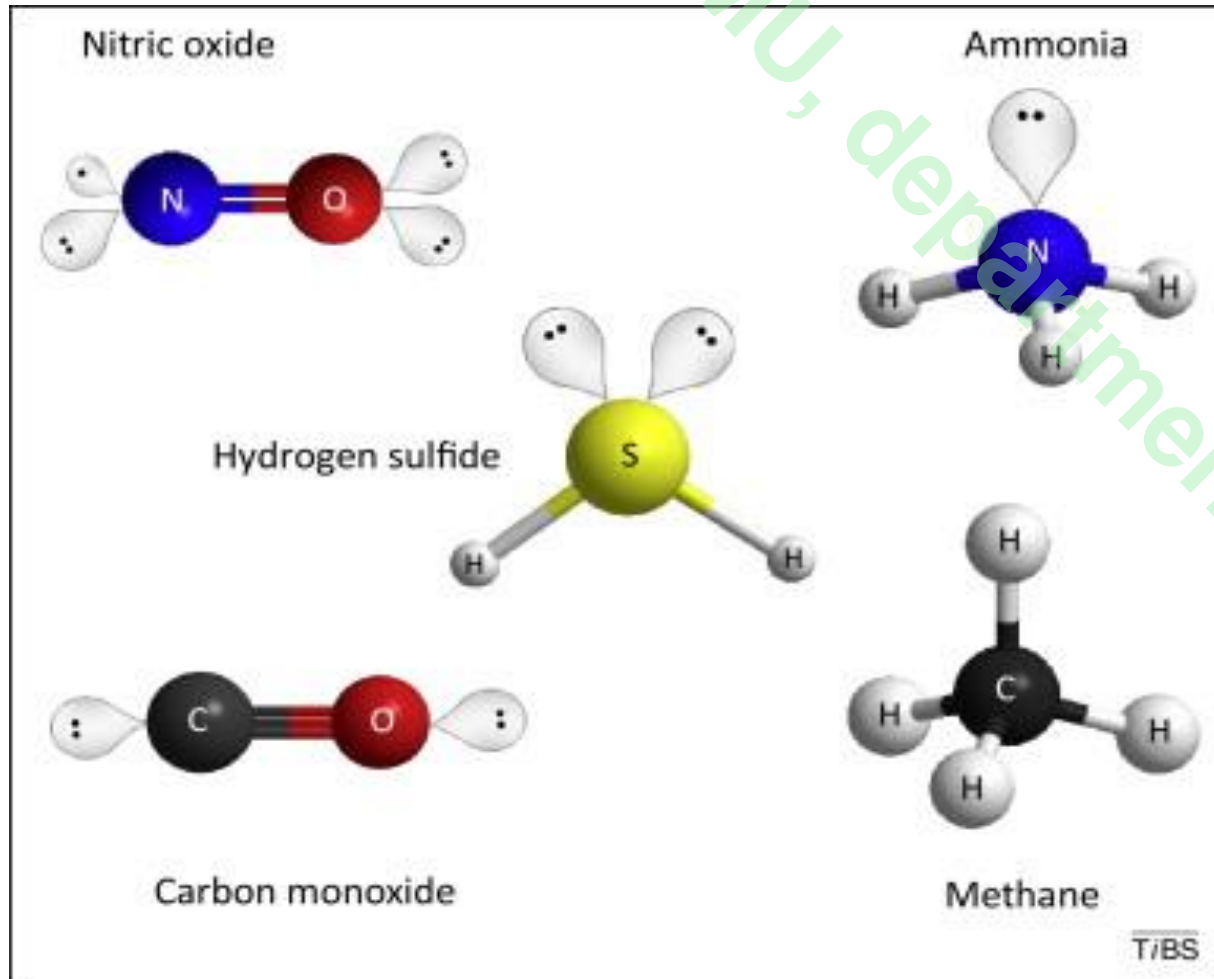
iNOS появляется при воспалении, иммунных и некоторых других реакциях в макрофагах и в ряде других клетках (гепатоцитах). NO легко проникает через мембрану и влияет на соседние клетки без участия рецепторов. NO может действовать как аутокринно (в той же клетке), так и паракринно (диффундировать к соседним клеткам).

Мишень NO - растворимая (цитоплазматическая) **гуанилатциклаза**.

Необычность этого фермента: он катализирует образование вторичного мессенджера – цГМФ, но активируется другим вторичным мессенджером – NO.

Мишенью цГМФ является протеинкиназа G (PKG).

Газовые посредники (мессенджеры) – новый класс сигнальных молекул



**Основные
представители класса
газотрансмиттеров**

Общие свойства газовых мессенджеров

- Небольшие липофильные молекулы, свободно проникают через мембраны
- Функционируют без участия мембранных рецепторов
- Проявляют эндокринный, паракринный и аутокринный эффекты
- Образуются эндогенно благодаря специальным ферментам
- Имеют специфическую функцию при физиологически значимых концентрациях.
- Функция газового посредника может быть имитирована экзогенно его аналогом (применение доноров)
- Клеточные эффекты газовых посредников могут быть прямыми или опосредованными вторичными посредниками, но всегда есть специфические клеточные и молекулярные мишени

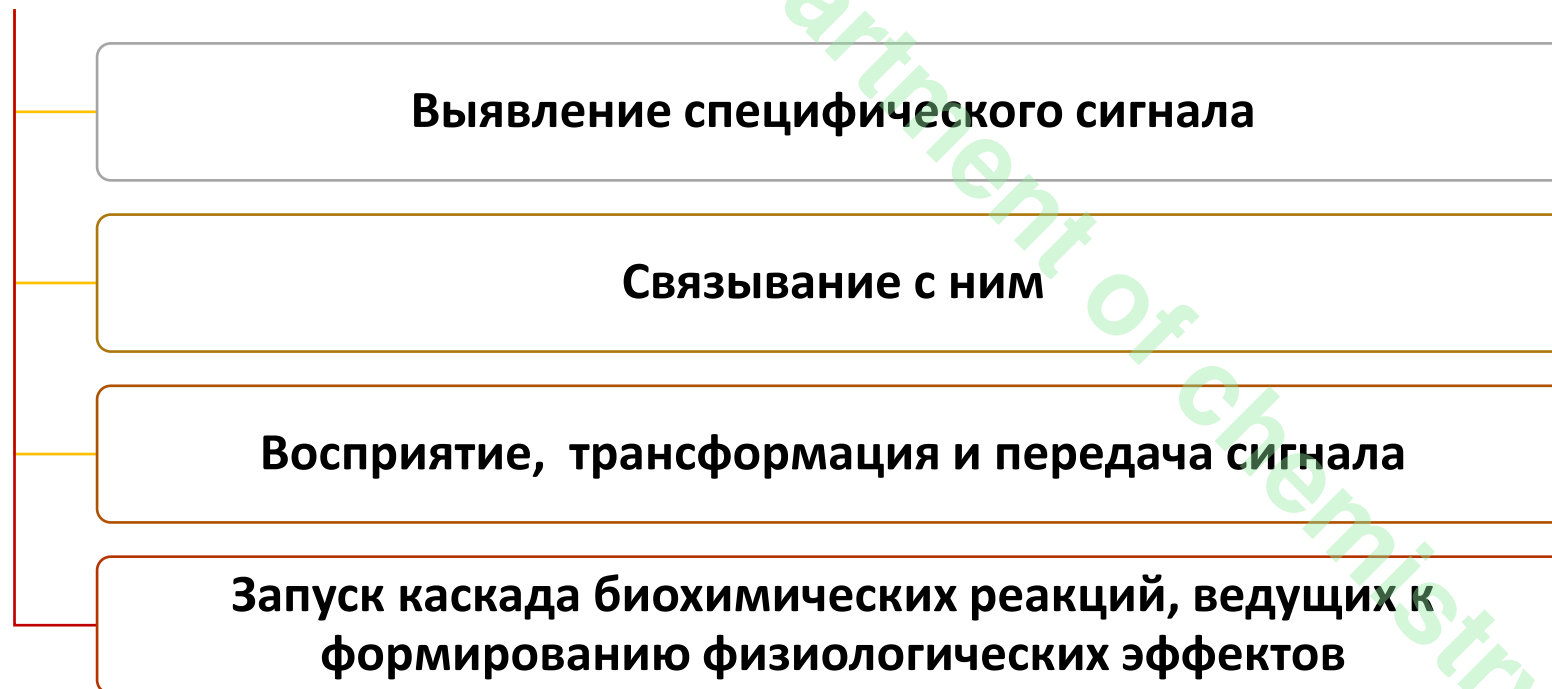
Клеточные рецепторы

Каждый тип клеток имеет специфический **набор (комплект, паттерн) рецепторов**. Это даёт возможность каждому типу клеток **специфически отвечать на одновременное воздействие нескольких типов сигнальных молекул**, «выбирая» из этого потока сигналов только те, которые важны для её жизнедеятельности.

Комплект рецепторов **для данного типа клеток – величина постоянная** (сформировался в ходе эволюции). Число рецепторов и их аффинность к лигандам может изменяться (элемент регуляции метаболизма).

- **Рецептор** – генетически детерминированные макромолекулярные сенсоры (белки, глико-, липопротеиды), локализованные в специализированных частях клетки (плазматическая мембрана, цитоплазма, ядро)

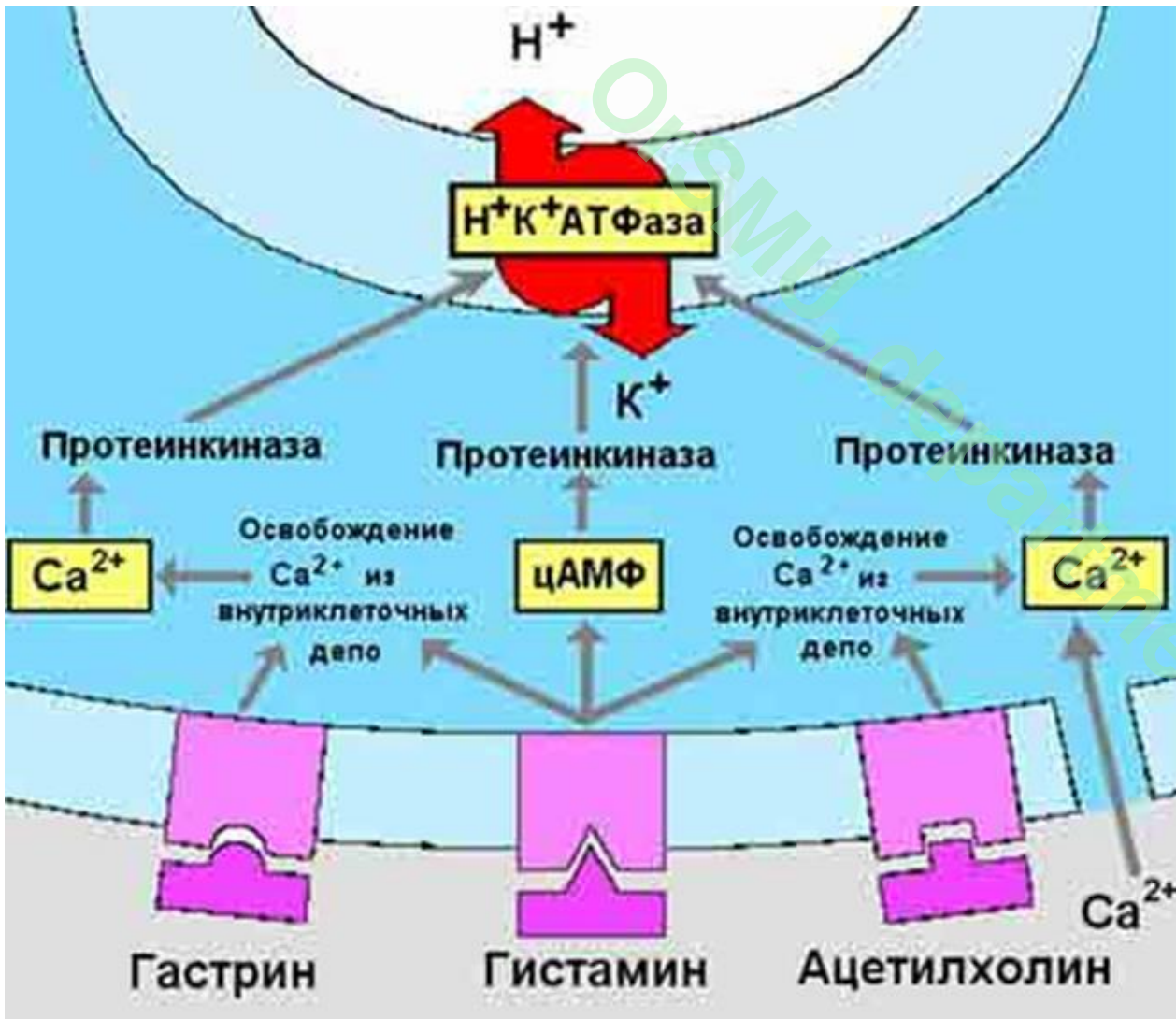
Назначение рецепторов



Определение понятия «клеточный рецептор»

Клеточный рецептор — молекула (чаще белок) или функциональная группа молекул находящаяся на поверхности клетки, клеточных органелл, или в цитоплазме, специфически реагирующая **изменением** своей **трехмерной конфигурации в ответ** на присоединение к ней определенной (специфичной) **молекулы, передающей внешний регуляторный сигнал**, и передающая этот сигнал внутрь

- 1) клетки,
 - 2) клеточного ядра или
 - 3) другой клеточной органеллы,
- непосредственно,
либо при помощи вторичных посредников,
либо меняя трансмембранный ионный поток.

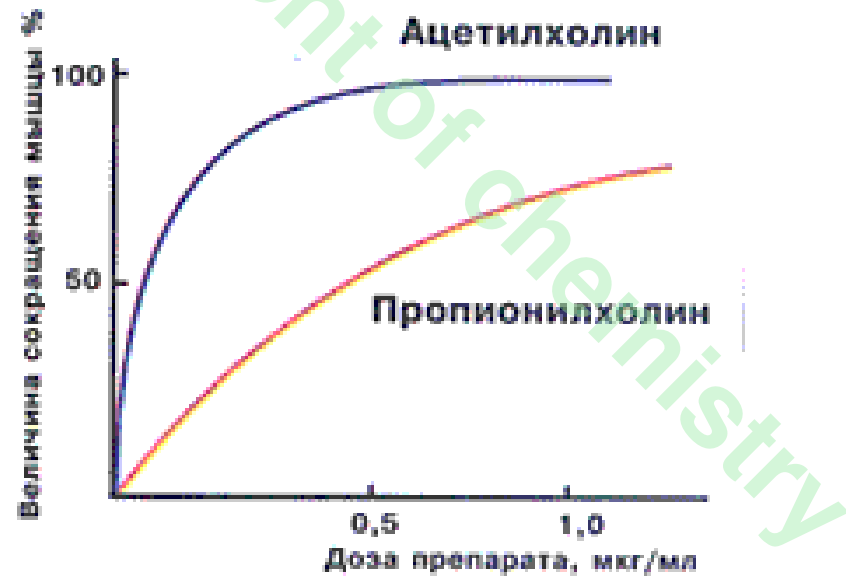
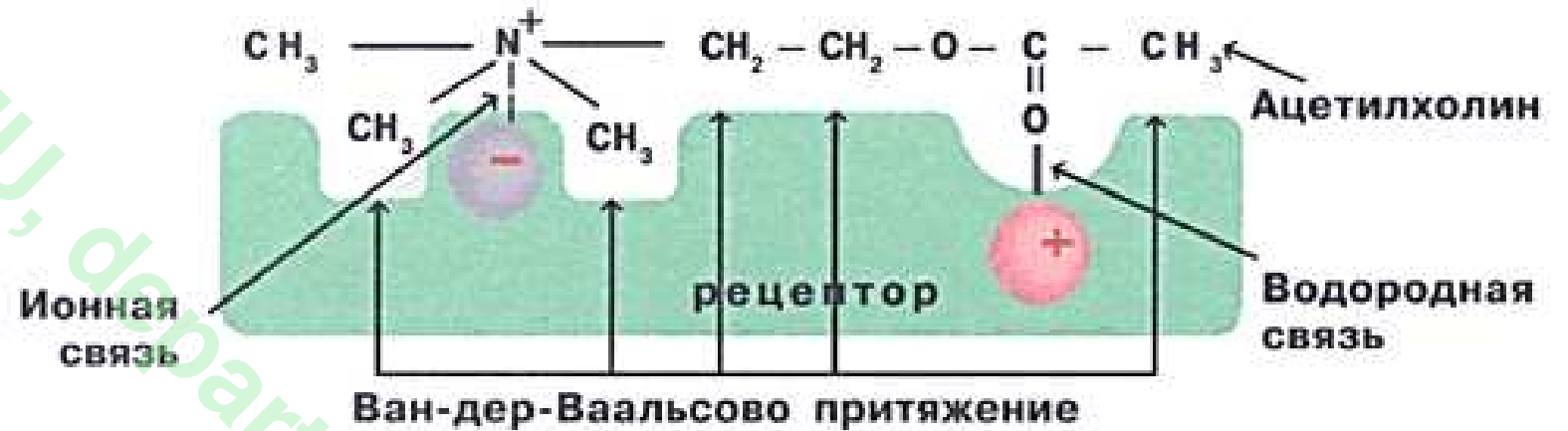
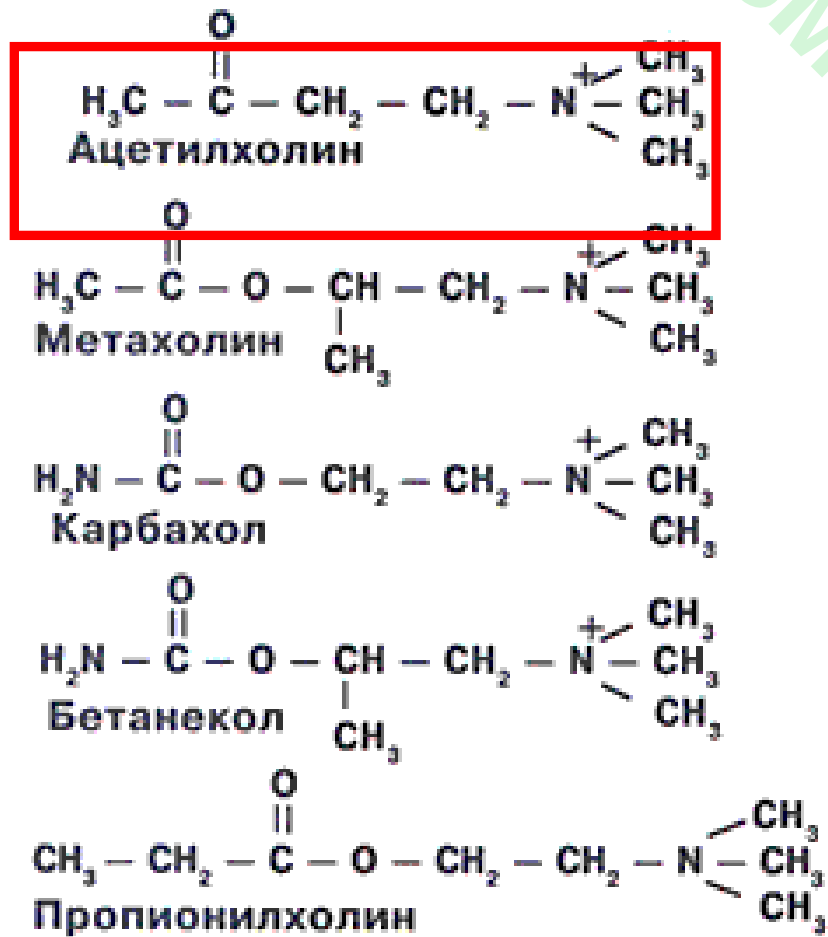


СЕЛЕКТИВНОСТЬ

СВОЙСТВО, ОСНОВАННОЕ НА СТРОГОЙ СТРУКТУРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ. ДАННЫЙ ЛИГАНД ДОЛЖЕН БЫТЬ ЛИБО **ЕДИНСТВЕННЫМ** ВЕЩЕСТВОМ, СВЯЗЫВАЮЩИМСЯ С РЕЦЕПТОРОМ, ЛИБО ЭФФЕКТИВНО КОНКУРИРОВАТЬ С ДРУГИМИ.

увеличивается концентрация кальция и цАМФ, это приводит к активации тубуловезикул, содержащих H⁺/K⁺-АТФазы

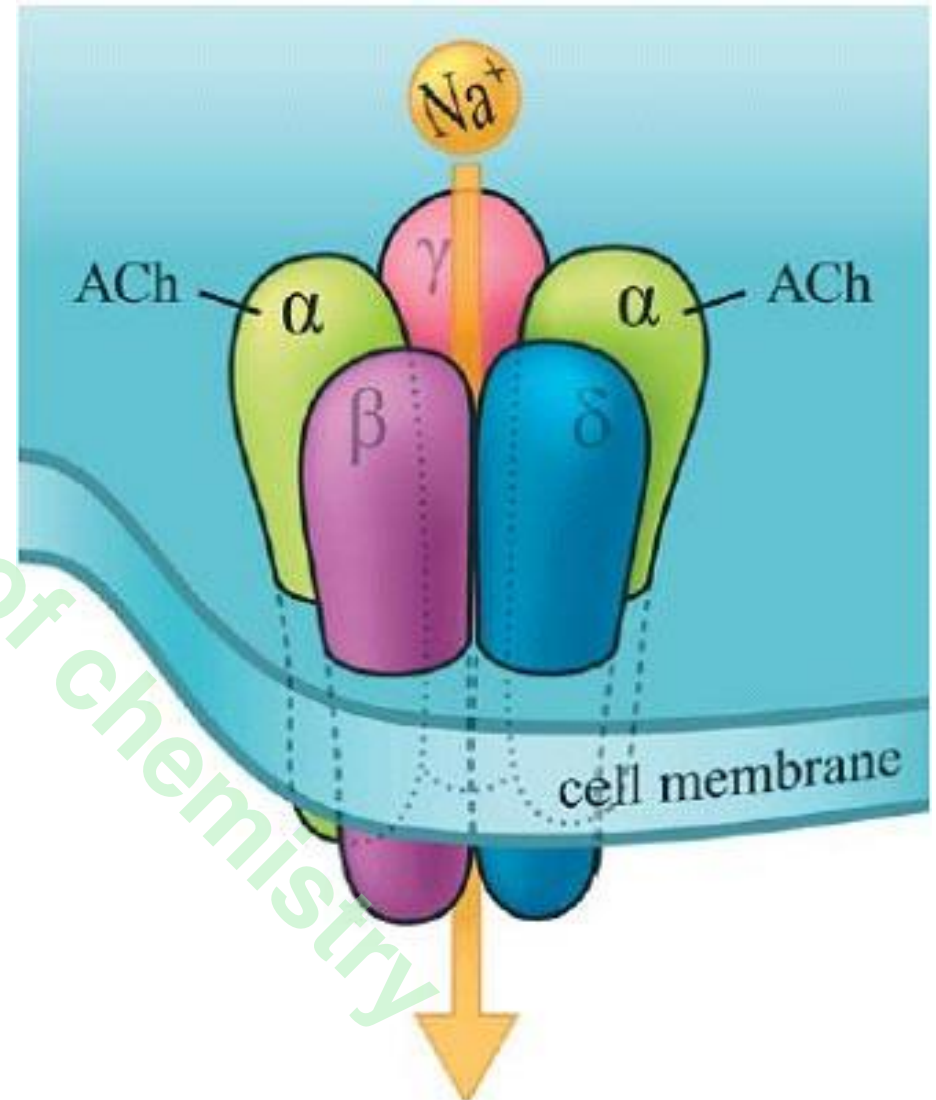
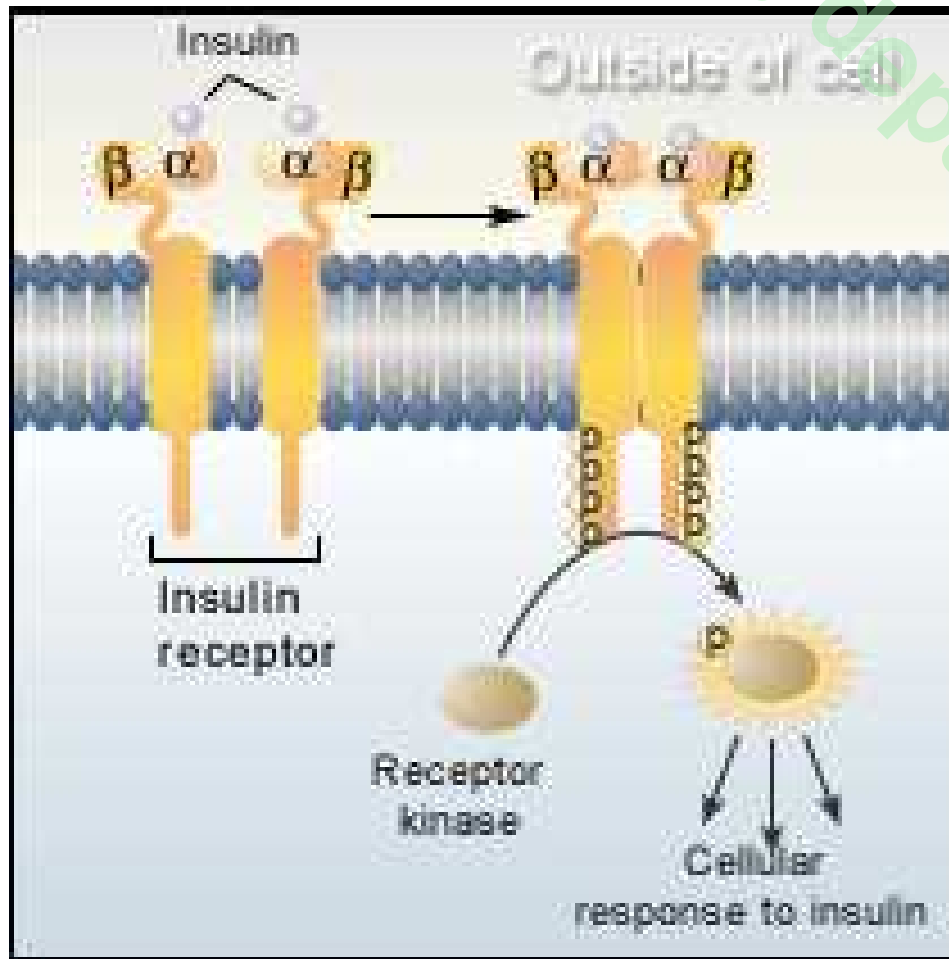
Селективность рецептора ацетилхолина



НАСЫЩАЕМОСТЬ

ЧИСЛО МЕСТ СВЯЗЫВАНИЯ С ЛИГАНДОМ ДОЛЖНО БЫТЬ КОНЕЧНЫМ.

Membrane receptors



СРОДСТВО К ЛИГАНДУ

НАСЫЩЕНИЕ РЕЦЕПТОРА ПРОИСХОДИТ ПРИ
ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ ЛИГАНДА

АКТГ — 0-50 пг/мл

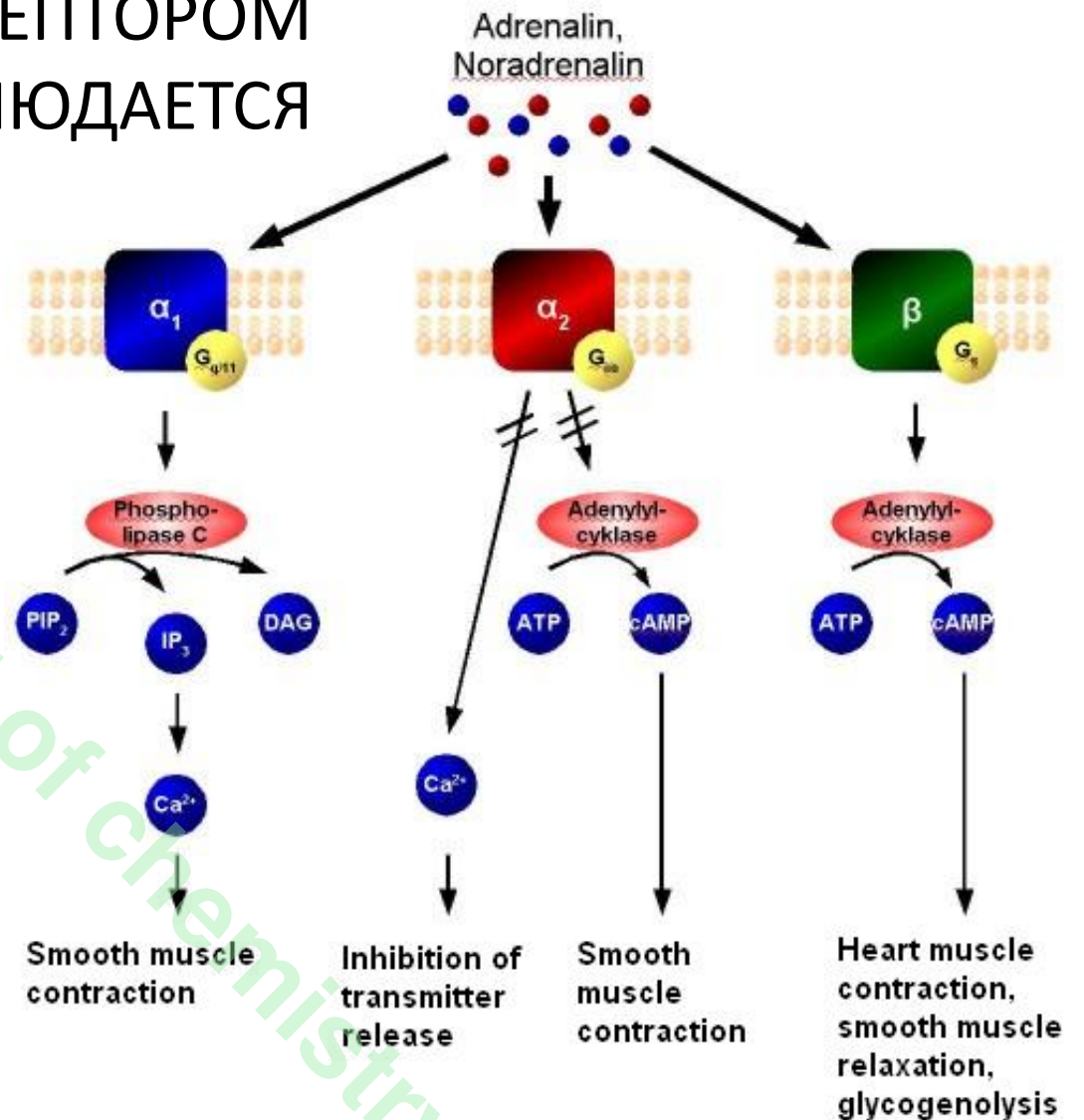
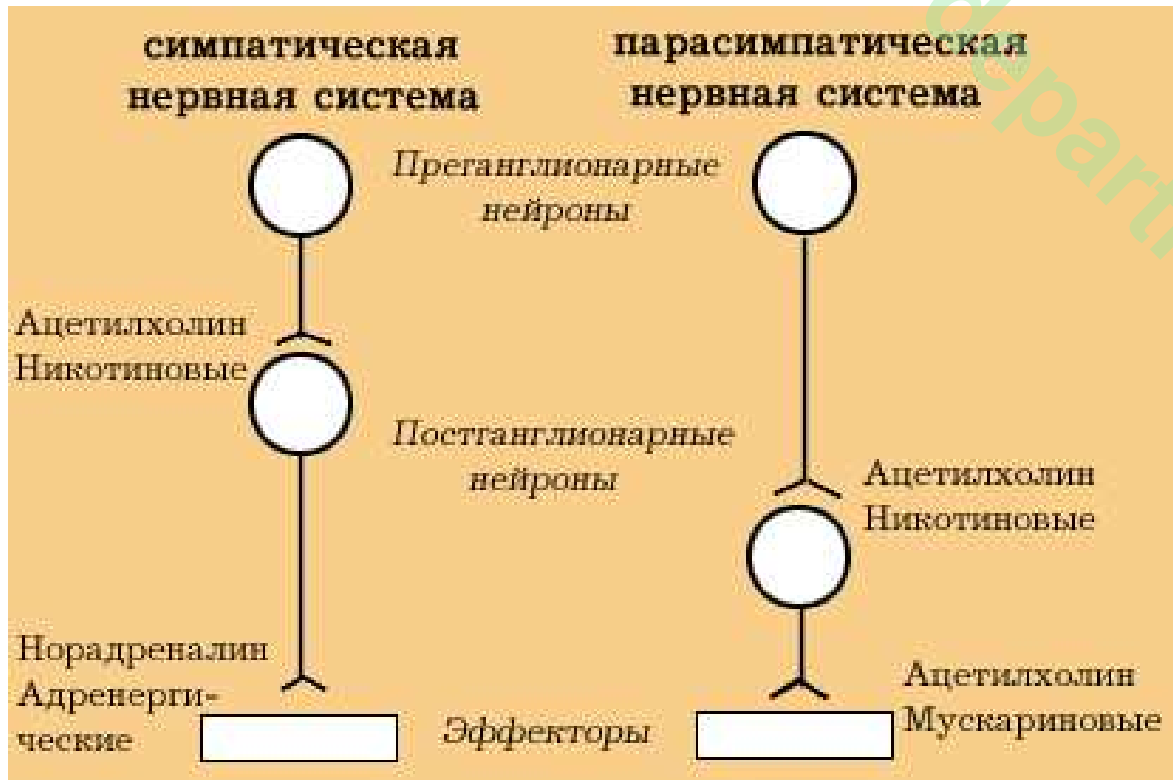
Тироксин общий (Т4) — 62-141 нмоль/л

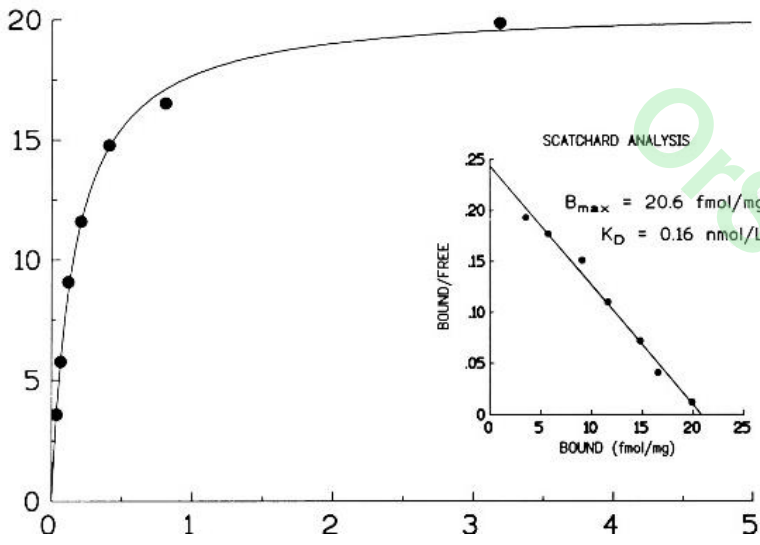
Кальцитонин — 5,5-28 пмоль/л.

Данные приведены для плазмы крови

ТКАНЕВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

СВЯЗЫВАНИЕ ЛИГАНДА С РЕЦЕПТОРОМ ПРОИСХОДИТ В ТОЙ ТКАНИ, ГДЕ НАБЛЮДАЕТСЯ ЕГО БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ.





Итого: чтобы быть рецептором молекулы белков должны отвечать ряду требований:

обладать высоким сродством (специфичностью) к

лиганду

ткани

что определяет наличие или отсутствие данных функций в клетках органа-мишени;

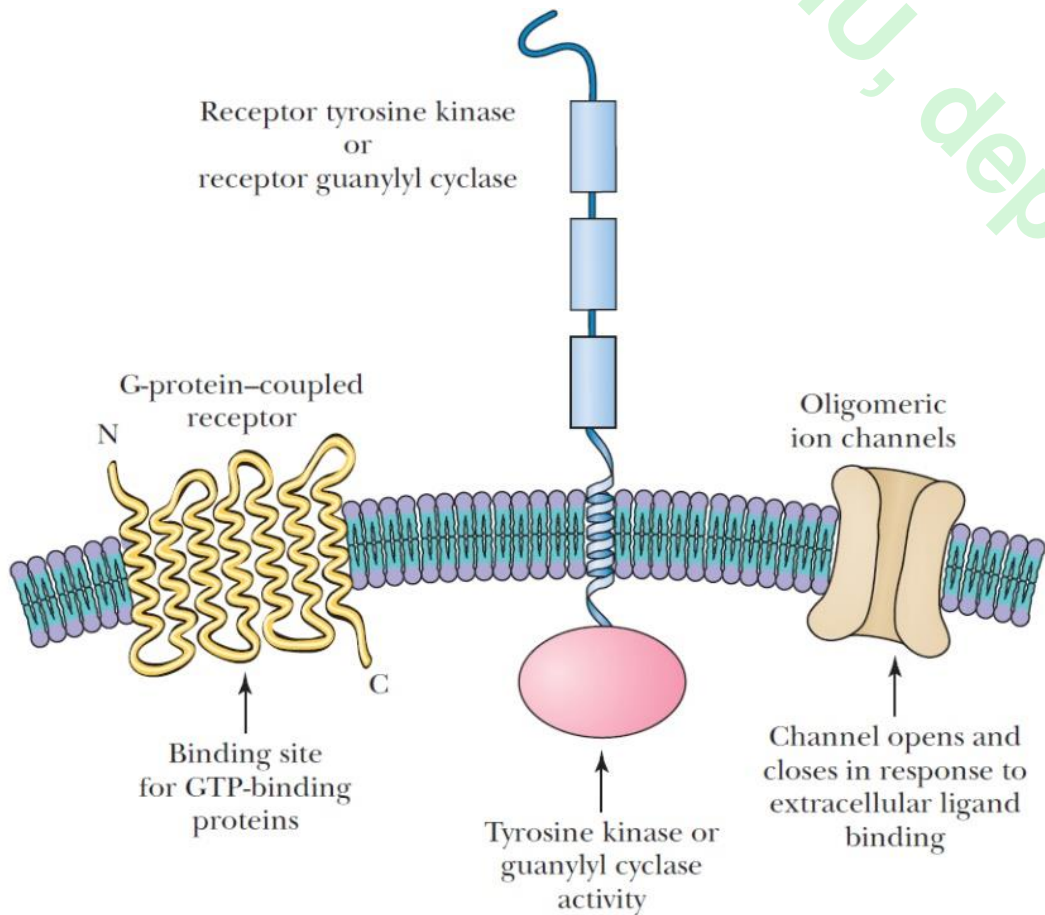
❖ кинетика связывания лиганда должна описываться кривой с насыщением (график Скэтчарда), то есть, состоянием полной занятости медиатором всех молекул рецепторов, число которых на мембране мало и ограничено;

❖ связывание лиганда и его клеточный (физиологический) эффект должны быть:

обратимы,

параметры сродства должны соответствовать физиологическим концентрациям лиганда.

Классификация молекулярных клеточных рецепторов по строению и локализации



I. Трансмембранные

- a) Семисегментные (семиспиральные) трансмембранные (7-TMS)
- b) Односегментные трансмембранные (1-TMS)
- c) Лигандзависимые ионные каналы

II. Внутриклеточные

- a) Цитозольные
- b) Ядерные

Основные структурные элементы мембранных рецепторов (рецепторов клеточной поверхности)

Рецепторы - **гликопротеиды**. Распознав специфический лиганд (первичный мессенджер) и связавшись с ним, **рецептор изменяет свою конформацию**, что необходимо для передачи сигнала внутрь клетки на молекулу-мишень, часто с **помощью вторичного мессенджера**.

- **Внеклеточный домен**. Его формирует N-конец цепи, функция – распознать и связаться с молекулой первичного мессенджера.
- **Трансмембранный домен**. Состоит из одной или нескольких α -спиралей (ацетилхолиновый рецептор формирует трансмембранную пору или ионный канал). При связывания лиганда домен меняет свою конформацию, влияя на конформацию внутриклеточного домена, либо пропускает специфический ион.
- **Внутриклеточный (цитоплазматический) домен**. Формирует C-конец цепи, функция - передача сигнал от первичного мессенджера внутрь клетки. Два пути:
 - домен связывается с внутриклеточными сигнальными белками (посредниками), которые доставляют сигнал к месту - молекуле-мишени;
 - домен может сам обладать ферментативной активностью, либо связывается с внутриклеточным ферментом и активирует его.

Классификация рецепторов клеточной поверхности (рецепторов клеточной мембраны)

1. **Рецепторы, сопряженные с G белками** (G-protein coupled receptors – GPCR) или семиспиральные рецепторы.
2. **Каталитические рецепторы** – обладают собственной **тирозин-** и **серин/треонин-протеинкиназной активностью**, либо **гуанилатциклазной активностью**.
3. **Рецепторы не каталитические** – после активации лигандом приобретают способность взаимодействовать с цитозольными тирозиновыми протеинкиназами, активируя их.
4. **Регулируемые ионные каналы** (лиганд-активируемые ионные каналы).

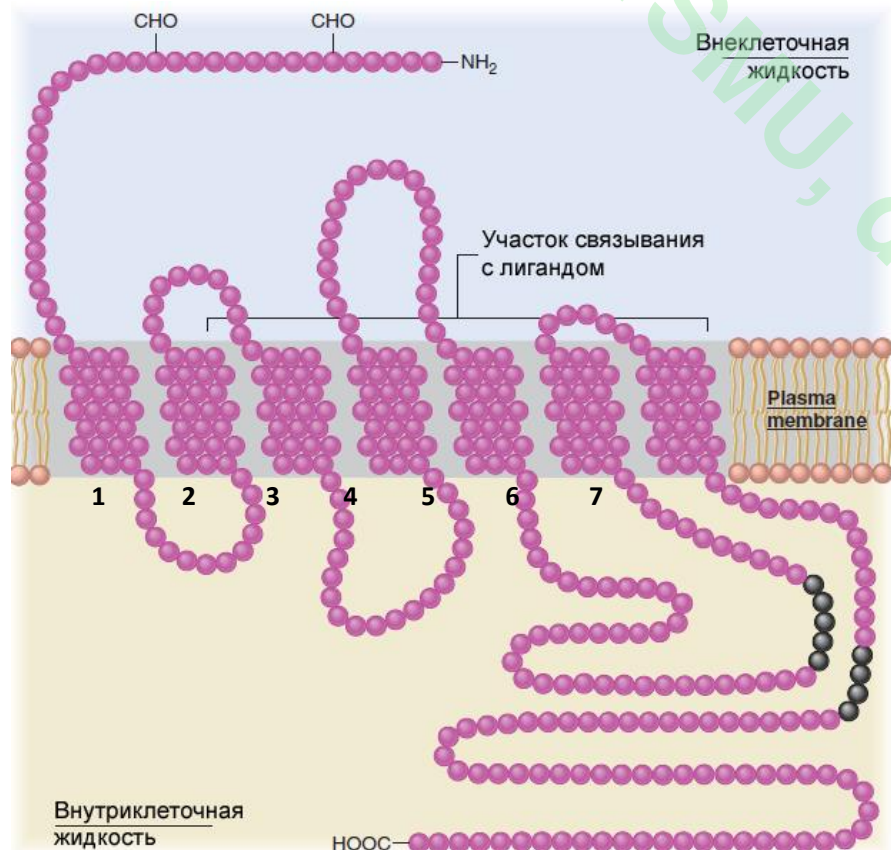
1. Рецепторы, сопряженные с G белками (G-protein coupled receptors – GPCR) или семисегментные (семиспиральные, серпантинные) рецепторы.

Образованы одной полипептидной цепью, 7 раз пронизывающей мембрану. Трансмембранные фрагменты – α -спирали (20-28 гидрофобных аминокислот). Самый эволюционно древний класс рецепторов, известно около тысячи различных лигандов (в т.ч. к этому классу относятся «орфан-рецепторы»). Типичные лиганды: **адреналин**, норадреналин, пептидные гормоны (в т.ч. **глюкагон**) - действуют через **β -адренорецепторы**, а также нейропептиды, дофамин, опиоиды.

После активации рецепторы обретают способность взаимодействовать с **гетеротримерными G-белками**, которые связаны с внутренним липидным слоем плазматической мембраны. G-белки состоят из трех субъединиц: α -, β - и γ -. Их активация приводит к диссоциации α -субъединицы от β, γ . Основной эффект оказывает α -субъединица (её разновидности):

- а). влияет на активность **аденилатциклазы**, которая синтезирует **цАМФ** (G_s и G_i -белки, содержащие G_{α_s} - и G_{α_i} – субъединицы).
- б). активирует **Флазу C γ** : синтез **ДАГ** и **ИЗФ** (G_{α_q} -белки).

Семисегментные трансмембранные рецепторы (7-TMS) имеют высокую степень гомологии у разных видов

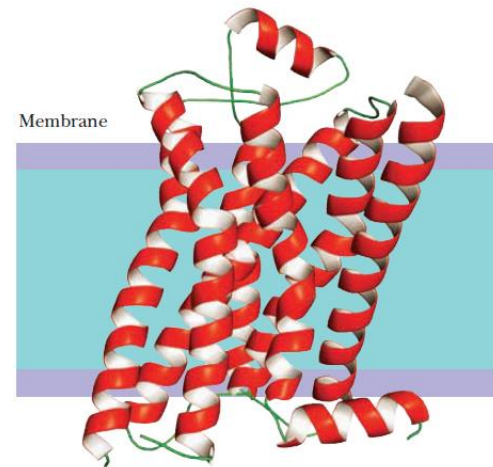


β-адренорецептор

Внеклеточный домен

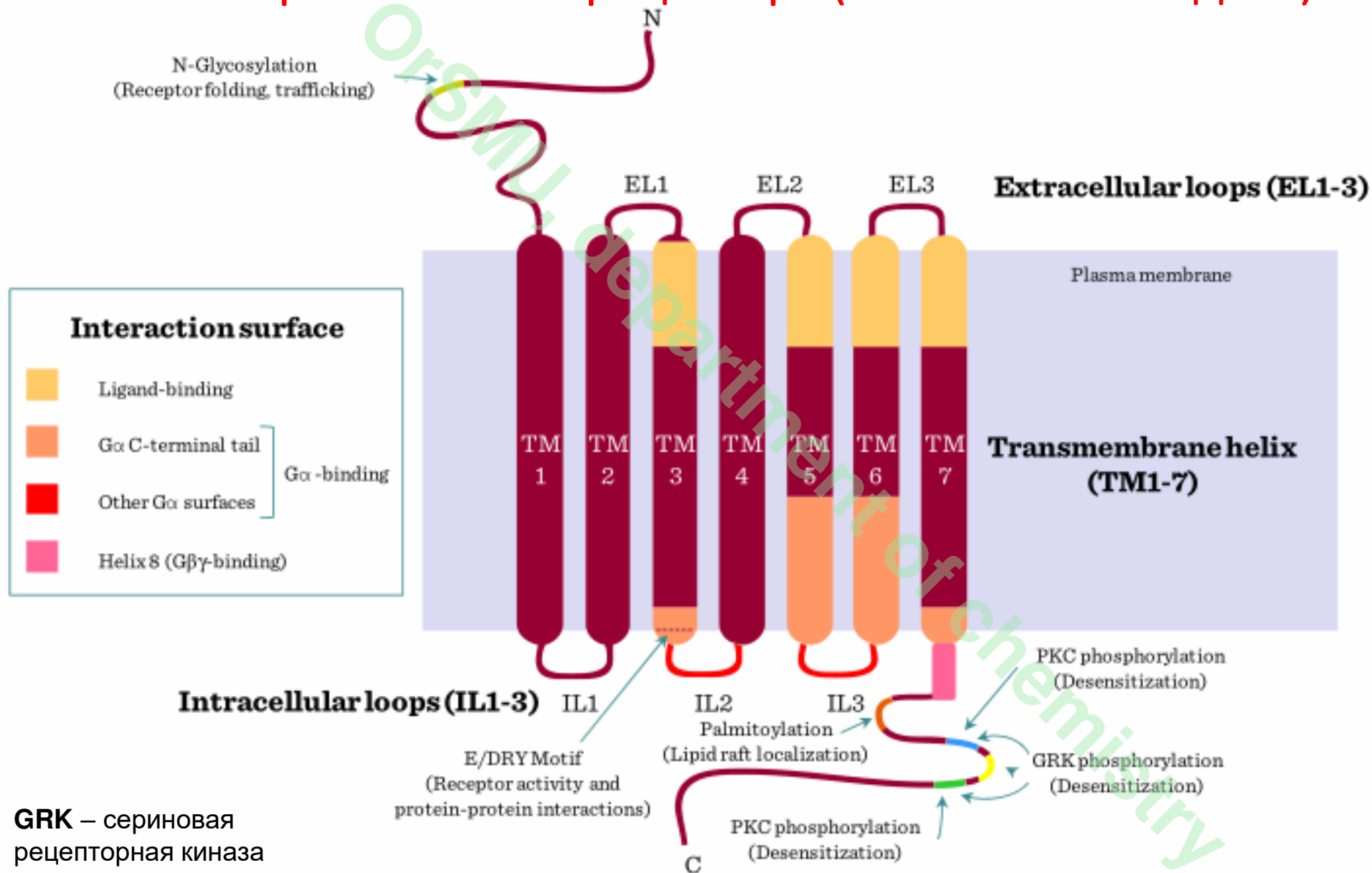
Трансмембранный домен

Внутриклеточный домен



Трансмембранные фрагменты – α-спирали (20-28 гидрофобных аминокислот).

Строение GPCR-рецептора (плоскостная модель)

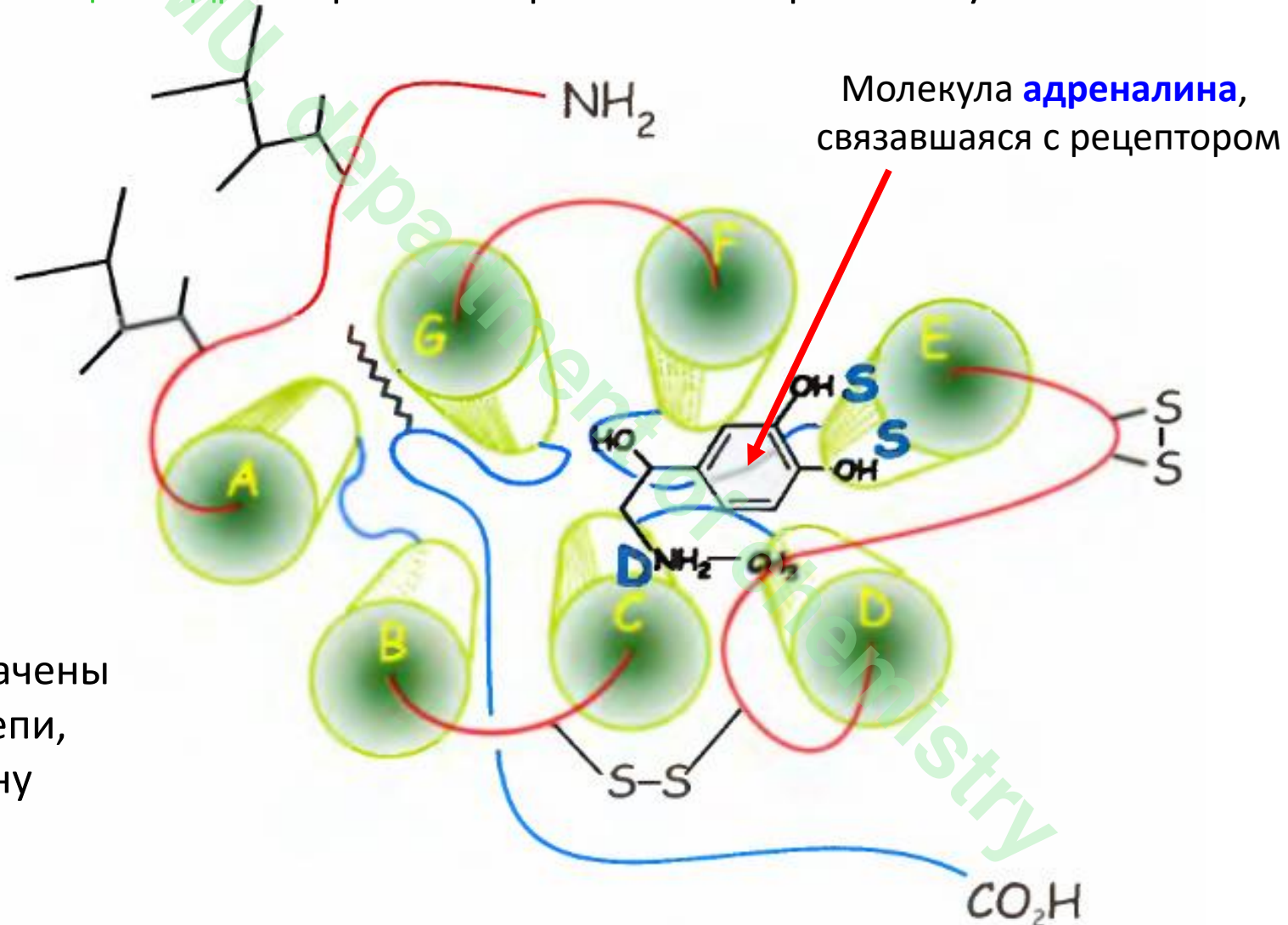


GRK – сериновая рецепторная киназа

3D-модель GPCR - рецептора

Плоскость слайда – соответствует наружной поверхности клеточной мембраны.

Красным цветом обозначены участки пептидной цепи, обращенные во внеклеточное пространство. **Зеленые цилиндры** – трансмембранные α -спиральные участки белковой цепи.



Синим цветом обозначены участки пептидной цепи, обращенные в сторону цитоплазмы.

Примеры 7-TMS рецепторов и их лигандов

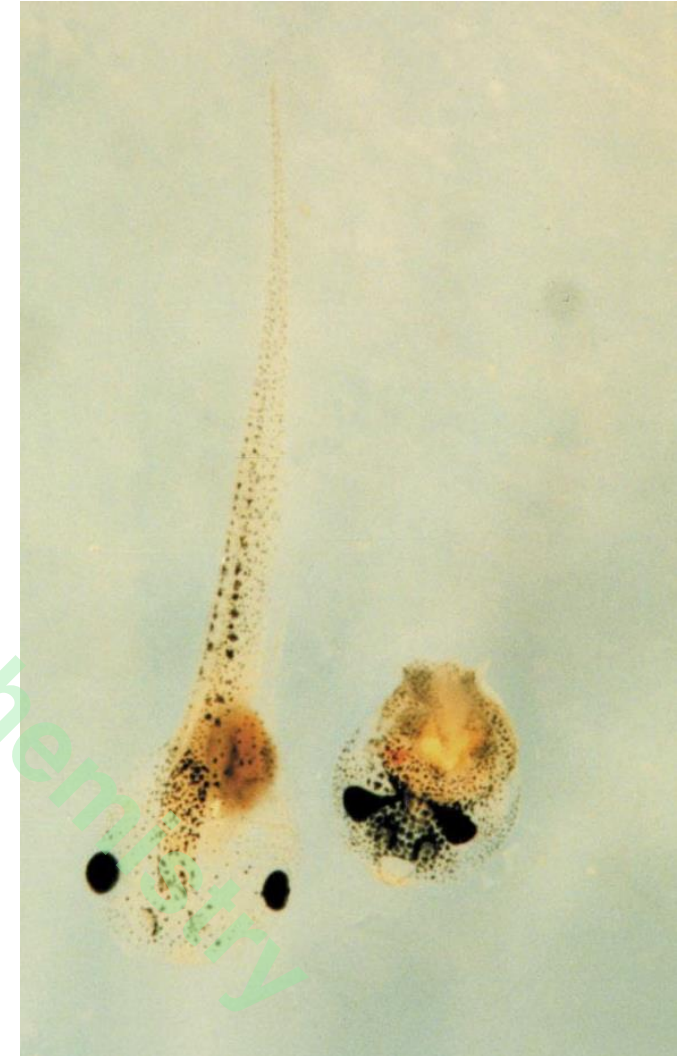
- Адренорецепторы:
 - α -адренорецепторы – имеют большее сродство (аффинность) к **норадреналину**
 - β -адренорецепторы - имеют большее сродство (аффинность) к **адреналину**
- **m-холинорецепторы** к **ацетилхолину**
- Рецепторы **АКТГ** (адренокортикотропного гормона)
- Рецепторы **ТТГ** (тиреотропного гормона)
- Рецепторы **АДГ** (антидиуретического гормона)
- Рецепторы **глюкагона**
- Рецепторы **дофамина**
- Рецепторы **аденозина** и многие другие

2. Каталитические рецепторы (односегментные трансмембранные рецепторы (1-TMS))

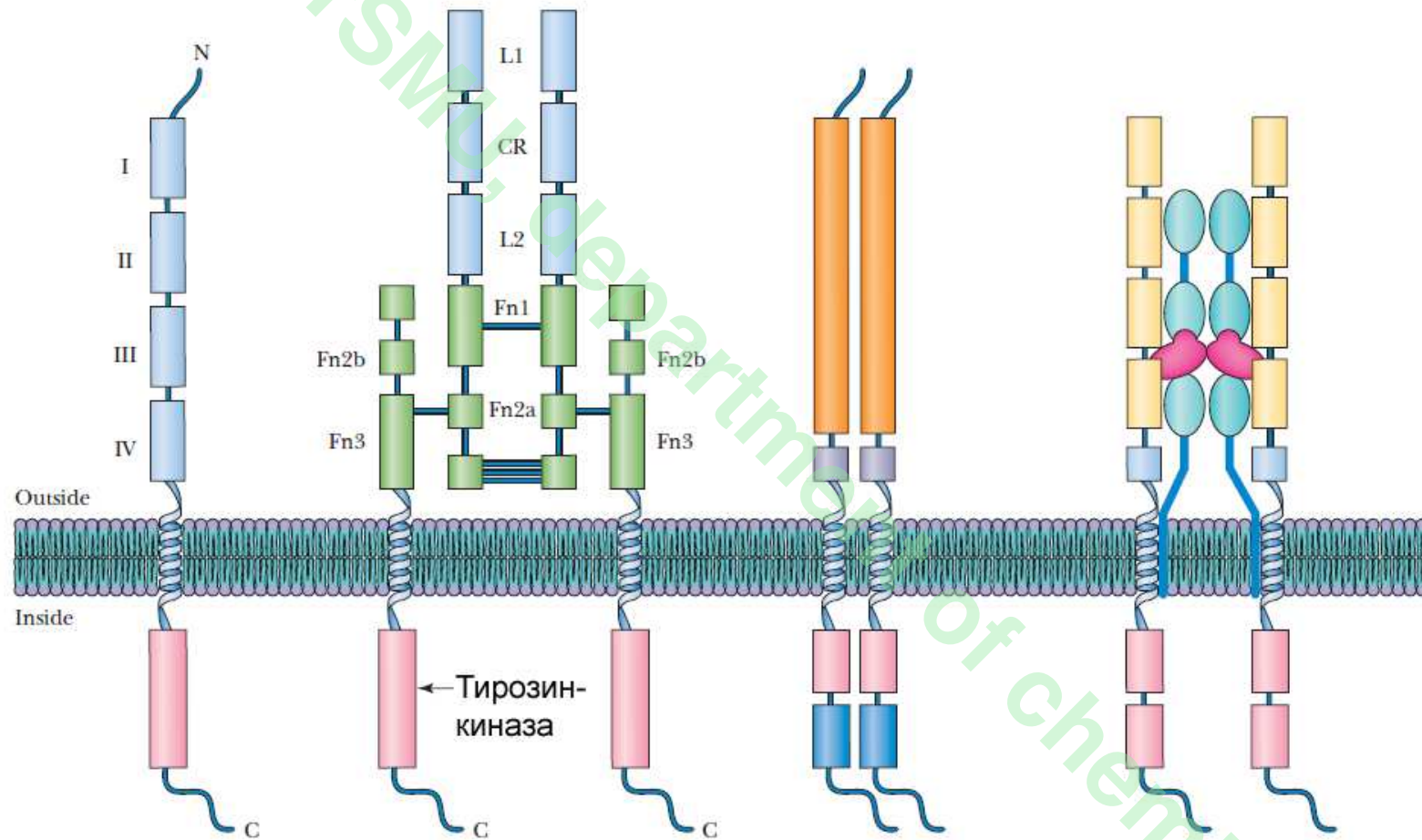
- Рецепторные тирозинкиназы (RTK) При активации киназный домен фосфорилирует аминокислотные остатки тирозина. Существует семь классов RTK с различными внеклеточными доменами.
- Рецепторные серин-треониновые киназы При активации киназный домен фосфорилирует аминокислотные остатки серина и / или треонина.
- Рецепторные тирозинфосфатазы . Внутренняя активность тирозинфосфатазы ферментативного домена подавляется при активации.
- Рецепторные гуанилилциклазы. Ферментативный домен генерирует второй мессенджер цГМФ из GTP после активации.
- Есть еще и фосфатазы!

Функции 1-TMS рецепторов

- Контроль **деления, роста и дифференцировки** клеток факторами роста и цитокинами
- Регуляция **гемопоэза, регенерации тканей, апоптоза**
- Контроль **иммунного ответа** (фагоцитоз, синтез антител)
- Обеспечение клеточной **адгезии**
- Регуляция **синтеза транспортных белков** (например, белка-переносчика глюкозы GLUT инсулином)



Односегментные трансмембранные рецепторы (1-TMS)



Примеры 1-TMS
рецепторов:

ЭФР

инсулиновый

ПНУП

нейротрофинов

2. Каталитические рецепторы (односегментные трансмембранные рецепторы (1-TMS)) – обладают собственной тирозин- или серин/треонин-протеинкиназной активностью (рецептор-ассоциированные киназы) и гуанилатциклазной активностью.

Вторая по численности группа рецепторов после GPCR. Рецепторы имеют один трансмембранный домен. В результате связывания с лигандом, конформация всей молекулы рецептора меняется, это приводит к димеризации рецептора и «включению» во внутриклеточных доменах **собственной ферментативной активности** (2 примера):

2.а. протеинкиназной (ПК) активности (тирозинкиназной активности);

2.б. гуанилатциклазной (ГЦ) активности.

2.a. Рецепторы с тирозинкиназной активностью.

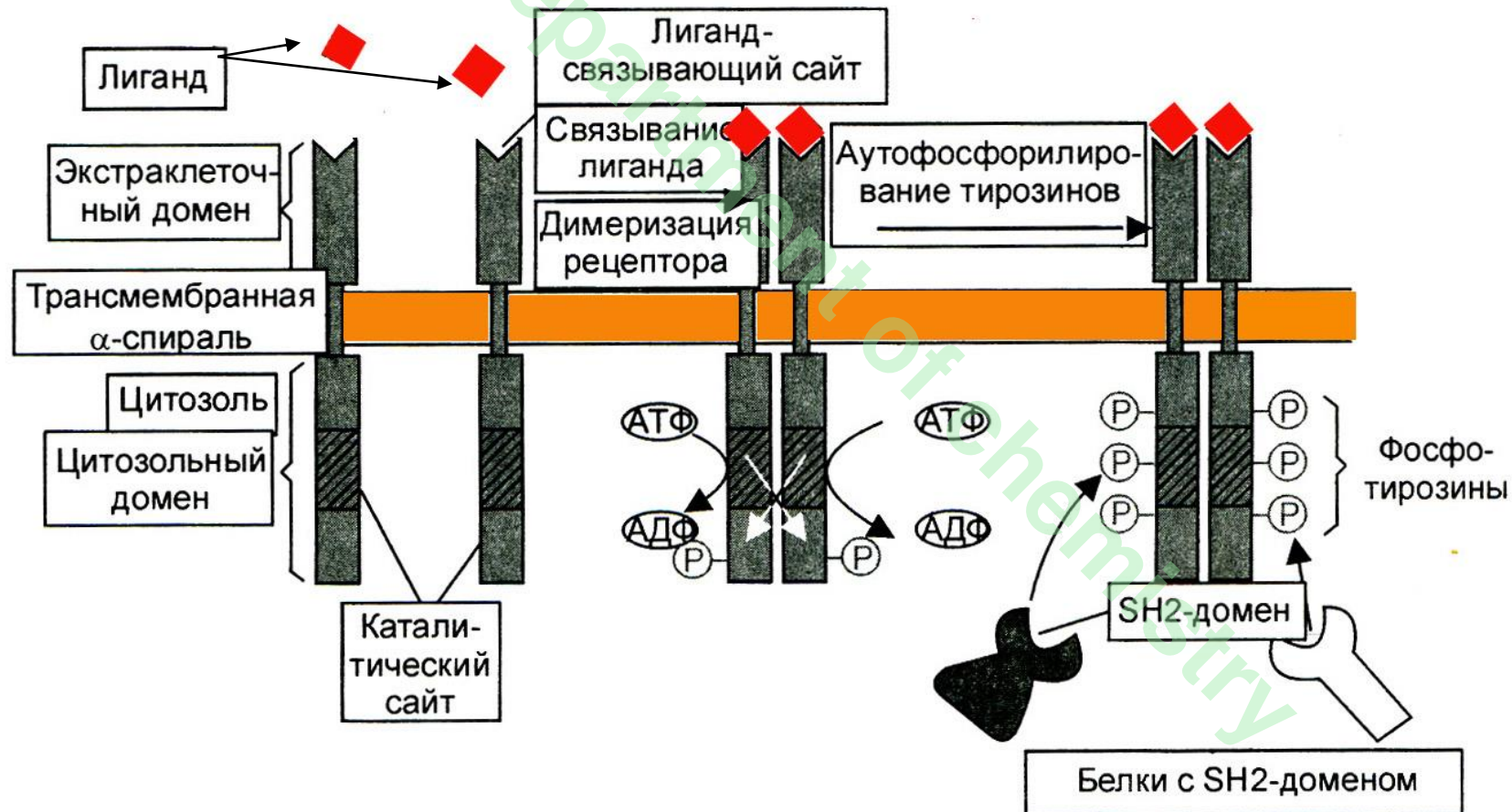
Важнейшие лиганды: **инсулин** и **различные факторы роста**.

Характерное проявление их активации и изменения конформации – образование димеров. Как **гомодимеров** (простое усиление сигнала), так и **гетеродимеров** - **два разных рецептора из этого же класса** (увеличение числа внутриклеточных сигнальных путей, запускаемых одним лигандом).

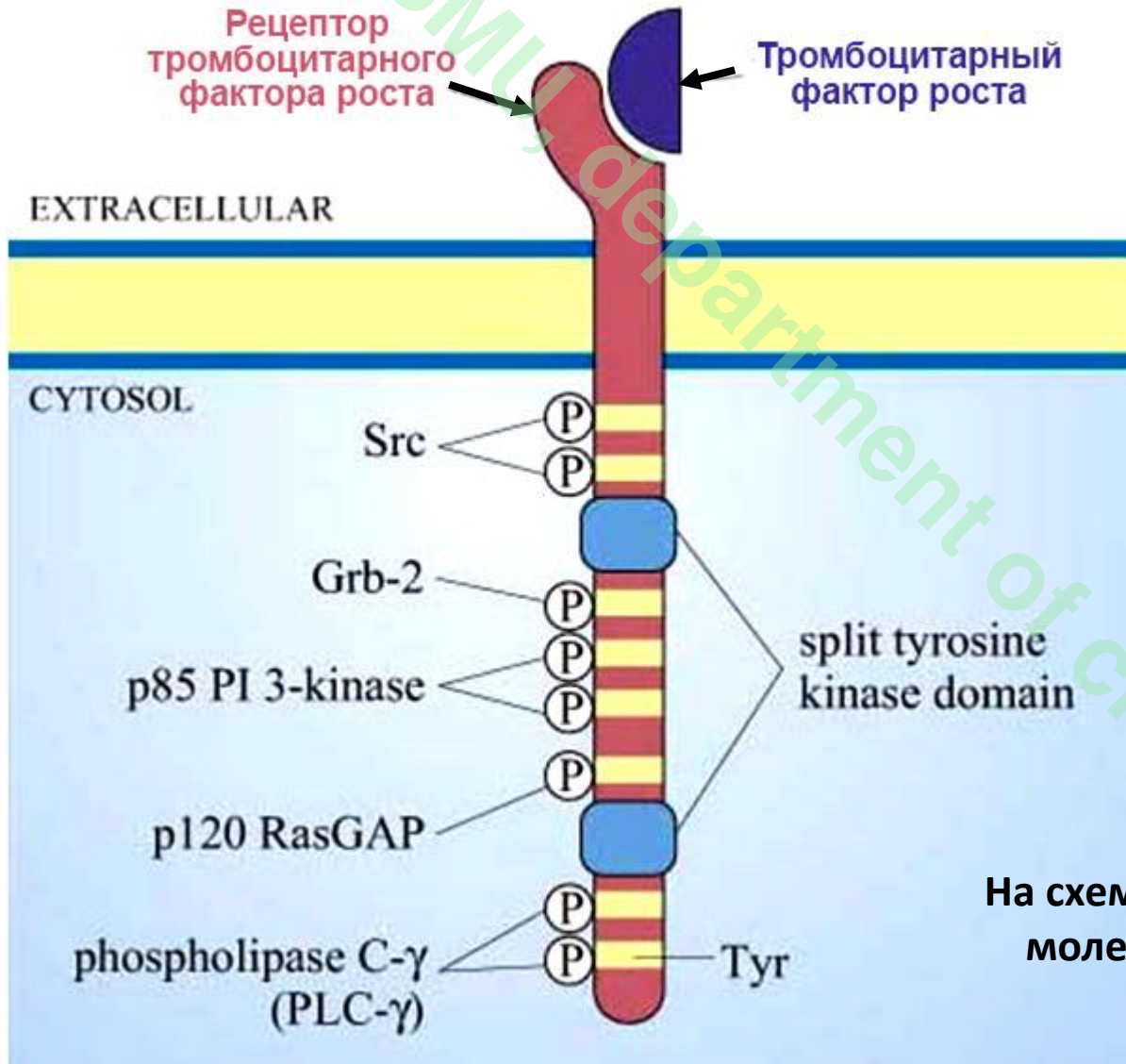
В результате димеризации рецепторов, в их цитозольных доменах «включается» тирозинкиназная активность. Благодаря ей происходит аутофосфорилирование остатков тирозина цитозольных доменов - на их поверхности появляются **фосфотирозины (докинг-участки)**, по которым связываются различные внутриклеточные сигнальные **белки – посредники**, содержащие **SH2-домены**.

Схема активации рецепторов, обладающих собственной тирозинкиназной активностью

Связывание лиганда с рецептором → димеризация → активация собственной тирозинкиназной активности → аутофосфорилирование остатков тирозина на поверхности цитозольных доменов рецепторов.



Образование нескольких фосфорилированных остатков тирозина на цитозольном домене активированного рецептора к тромбоцитарному фактору роста (результат аутофосфорилирования)



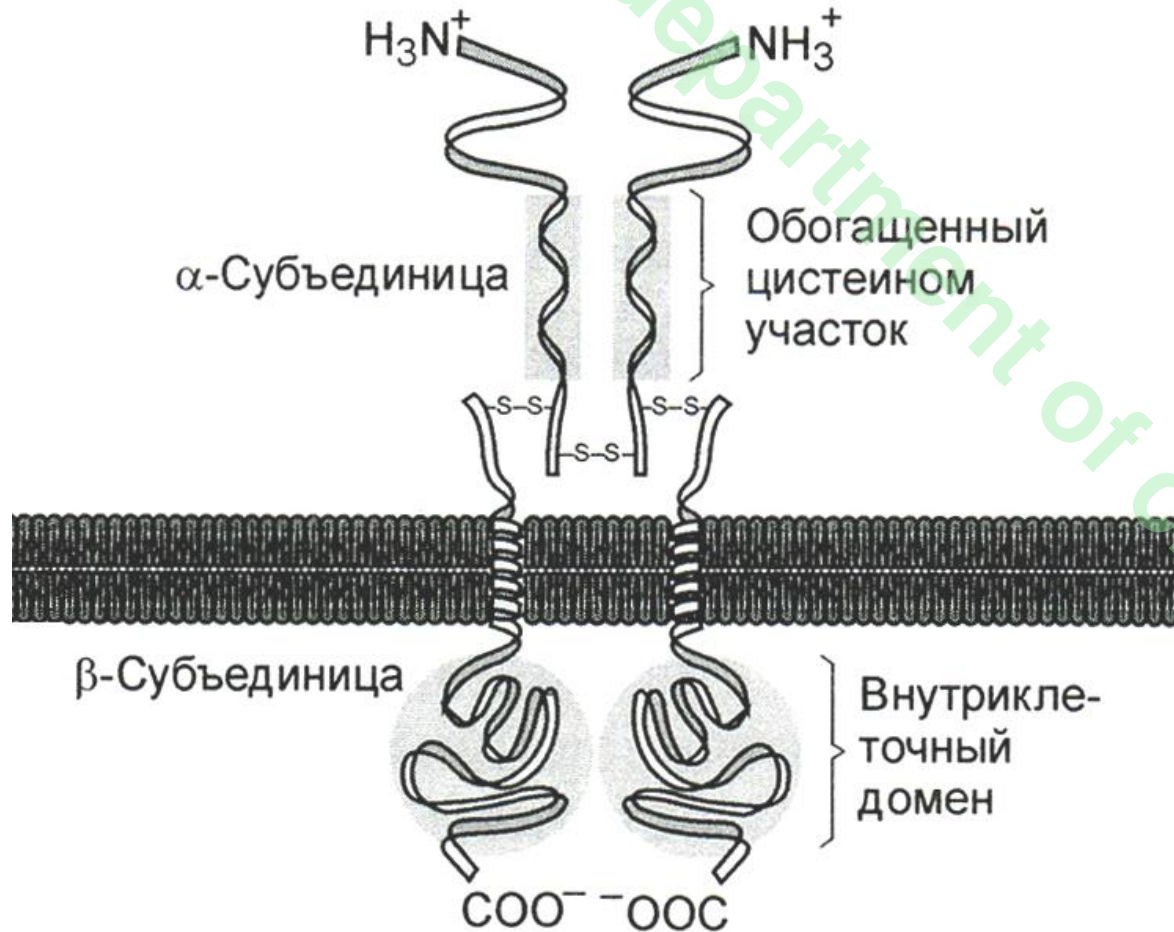
Фосфорилированные остатки тирозина, образуют **участки связывания (докинг-участки)** для внутриклеточных сигнальных белков (показаны на рисунке), содержащих SH2-домены.

SH2-домены распознают фосфотирозины.

На схеме показана одна из двух молекул димера рецептора

Рецептор инсулина – изначально является тетрамером:
2 α -субъединицы (распознавание и связывание гормона) и
2 β -субъединицы, соединённые **-S-S-** мостиками.

Рецептор инсулина



2.6. Рецепторные гуанилатциклазы (ГЦ) – катализируют синтез **вторичного мессенджера цГМФ (гуанозин-3'5'-монофос-фата)**

Рецептор локализован в цитоплазматической мембране. Цитозольный домен обладает активностью ГЦ: **ГТФ → цГМФ**

Рецептор имеет две изоформы.

1 изоформа: лиганд - **предсердный натрийуретический пертид (ПНП)**. ПНП высвобождается из эндотелиоцитов предсердий. ПНП действует на клетки собирательных трубочек почек и увеличивает в них концентрацию цГМФ. В результате почки усиливают выделение ионов Na^+ (и воды). Потеря воды снижает объем крови, что ослабляет стимул, вызвавший выделение ПНП.

В кровеносных сосудах цГМФ действует на гладкую мускулатуру цГМФ, вызывает вазодилатацию - увеличение просвета.

2 изоформа: лиганд – **гуанилин**. Это пептид, выделяемый эпителиоцитами кишечника. Гуанилин регулирует секрецию ионов Cl^- в кишечнике.

Рецептор гуанилина способен взаимодействовать с эндотоксином *E. coli* - усиливается секреция ионов Cl^- , что уменьшает реабсорбцию воды из кишечника - возникновение диареи.

цГМФ активирует цГМФ-зависимую ПК (PKG, ПКГ), которые фосфорилируют в белках-мишенях остатки серина и треонина.

цГМФ – разрушается специфической цГМФ-фосфодиэстеразой.

3. Рецепторы не каталитические –

после активации лигандом приобретают способность взаимодействовать с цитозольными тирозиновыми протеин-киназами.

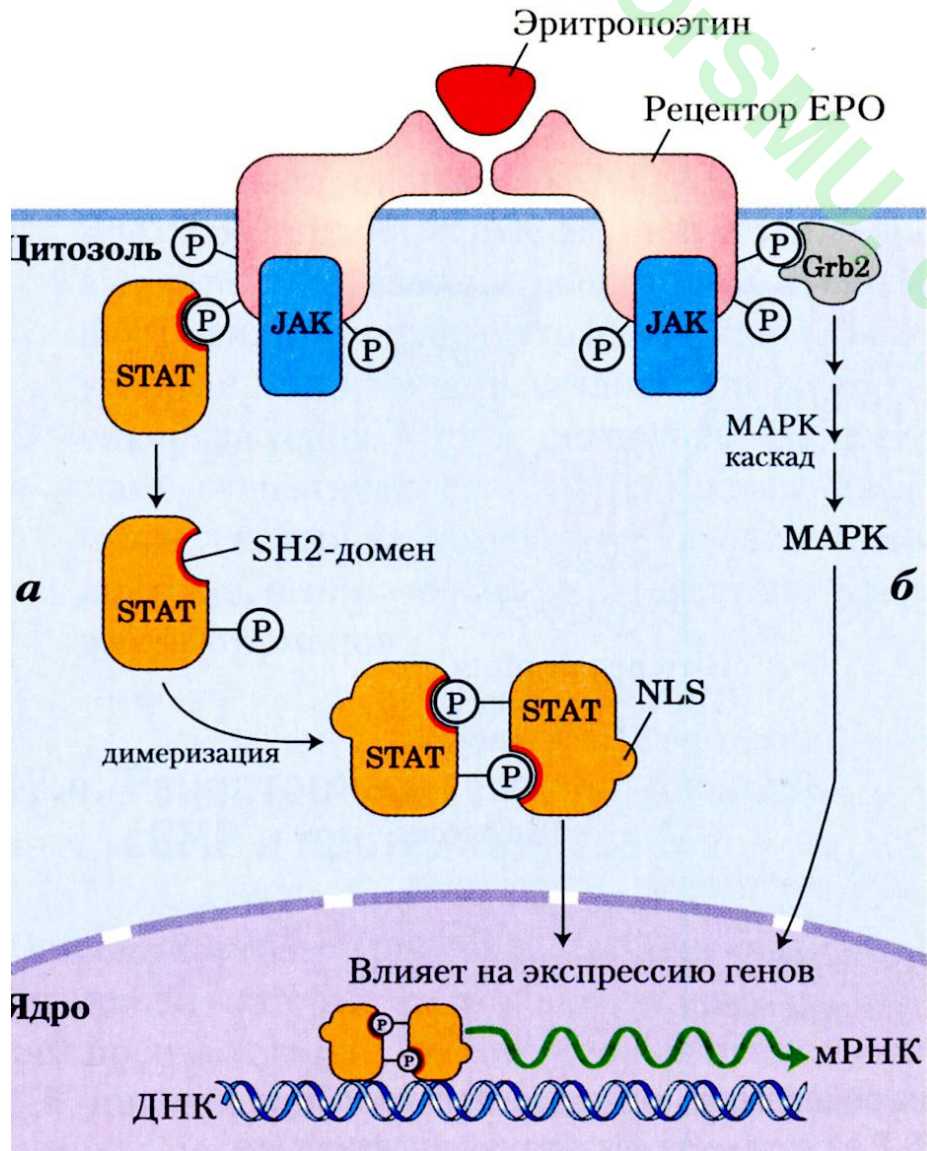
Рецептор активирует внутриклеточные киназы (рецепторы цитокинов)

Связывание лиганда с рецептором изменяет его конформацию и вызывает димеризацию. Типичные лиганды этого класса рецепторов: **ЦИТОКИНЫ**. Цитозольные домены рецептора приобретают способность нековалентно взаимодействовать с внутриклеточными **протеинкиназами** и активировать их:

- с тирозиновой киназой **Src** (прикреплена к внутреннему слою плазматической мембраны);
- с тирозиновой киназой **Янус-киназой (JAK)**, растворима в цитоплазме, содержит два активных центра: киназный и псевдокиназный).

Обе киназы фосфорилируют остатки тирозина в составе цитозольных доменов рецептора. Фосфотирозины нужны для связывания внутриклеточных **белков-посредников** (имеющих SH2-домены), которые передают сигнал «вниз по течению» к молекулам-мишеням.

Схема инициации двух сигнальных путей эритропоэтином путём образования гетеродимера из рецепторов с различными свойствами



Путь а) – активирует синтез белков, необходимых для созревания эритроцитов.

Путь б) – JAK активирует белок Grb-2, что запускает МАРК-каскад

JAK действуют посредством транскрипционных факторов: STAT - signal transducers and activation transcription). Неактивный STAT находится в цитоплазме. Связывание STAT с фосфотирозином рецептора создаёт условия для его фосфорилирования с участием JAK. JAK сначала фосфорилирует остатки тирозина в рецепторе, затем в STAT. Активный (фосфорилированный) STAT образует гомодимер, который проникает в ядро и вызывает экспрессию специфических генов.

Важно: к фосфотирозинам цитозольного домена рецептора цитокина эритропоэтина (образовавшимся с участием JAK) может также присоединяться белок Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2). После фосфорилирования с участием JAK, Grb2 запускает МАРК-каскад (подобно инсулину), что также изменяет экспрессию специфических генов. Ещё один пример того, как один цитокин может одновременно запускать два сигнальных внутриклеточных пути: JAK-STAT-путь и МАРК-каскад.

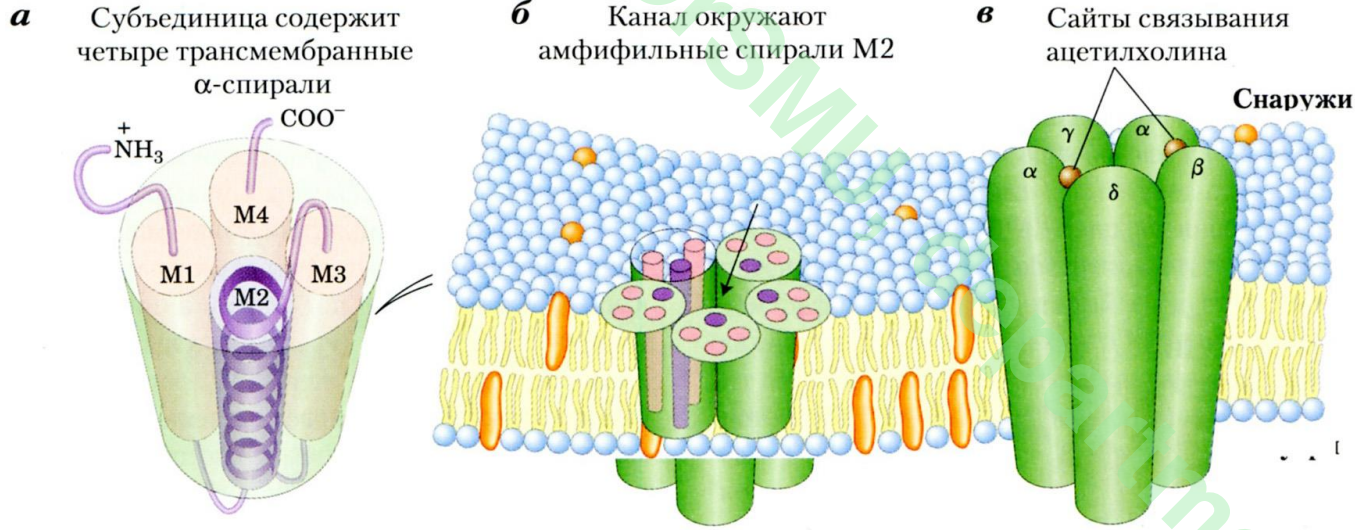
4. Регулируемые ионные каналы (лиганд-активируемые ионные каналы или каналы, сопряженные с рецептором).

Типичный пример: **n-ацетилхолиновый рецептор**.

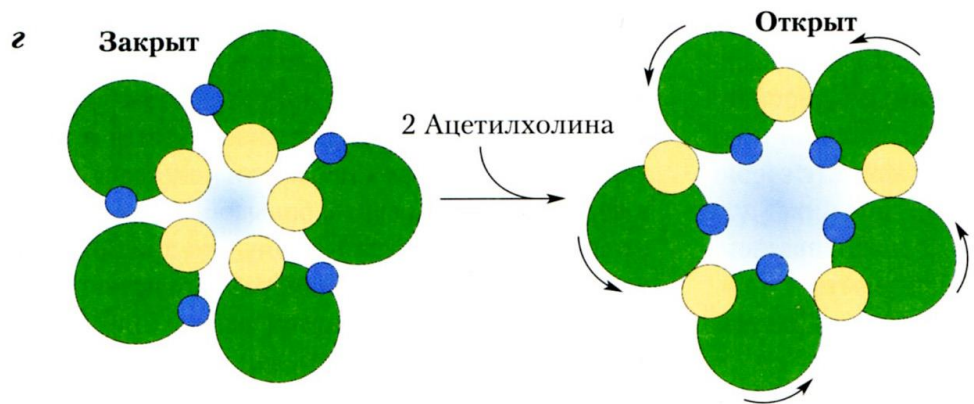
Молекула рецептора имеет бочкообразный силуэт и образована пятью субъединицами (**2a**, **b** -, **g**- и **d**- субъединицы). В состав каждой субъединицы входит по 4 α -спирали. Их C- и N-концы обращены в цитоплазму. Субъединицы окружают одну трансмембранную пору. Есть два участка для связывания двух молекул **ацетилхолина**, расположенных на двух α -субъединицах со стороны поры. Ниже расположена «заслонка», образуемая α -спиралью. При связывании с ацетилхолином, рецептор претерпевает конформационную перестройку, что вызывает смещение «заслонки» - пора открывается и ионы Na^+ входят в цитоплазму.

Ионные каналы **открываются на несколько миллисекунд**, но за это время через канала проходит поток ионов, **$V=10$ млн. ионов/с**.

Схема работы регулируемого ацетилхолином ионного канала



Связывание лиганда приводит к повороту спирали M2, что увеличивает диаметр канала – появляется проход для ионов.

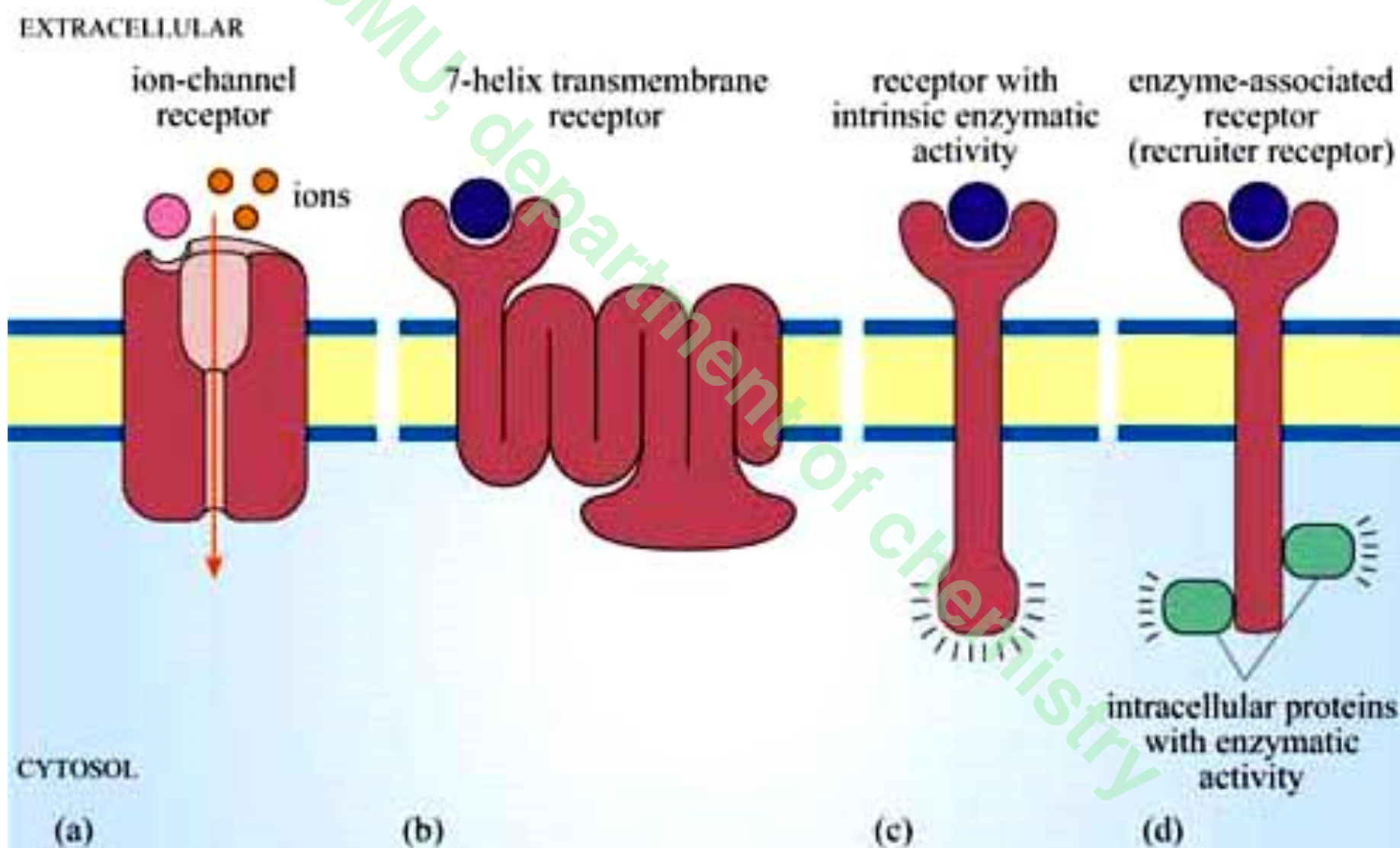


В спирали M2 крупные гидрофобные боковые цепи остатков Leu закрывают канал.

Связывание двух молекул ацетилхолина вызывает проворачивание спиралей M2.

Теперь в канал обращены полярные остатки меньшего размера.

Четыре основных класса рецепторов цитоплазматической мембраны



Основные механизмы активации мембранных рецепторов

1. Конформационная перестройка (рецепторы-ионные каналы и GPCR);
2. Димеризация (рецепторы с собственной ферментативной активностью и рецепторы, рекрутирующие внутриклеточные ферменты).

Основные механизмы инактивации мембранных рецепторов

1. **Деградация лиганда.** Холинэстераза разрушает ацетилхолин, связанный со своим рецептором.
2. **Секвестрация лиганда.** Лиганд связывается с **внеклеточным белком**, содержащим лиганд-связывающий домен. Такой белок удаляет лиганд с рецептора.
3. **Десенситизация рецептора.** GPCR может быть фосфорилирован по остаткам серина в цитозольном домене при помощи внутриклеточной ПКС. По этим участкам связывается внутриклеточный белок **аррестин**. **Комплекс рецептор-аррестин уже не способен передавать сигнал «вниз по течению».** Комплекс рецептор-аррестин поглощается путём эндоцитоза.

Внутриклеточные рецепторы

Связывают **малые, липофильные молекулы**, которые легко преодалевают барьер цитоплазматической мембраны: **стероидные и тиреоидные гормоны**, а также **витамин Д**. Локализация: цитоплазма, поверхность ядра и внутри ядра.

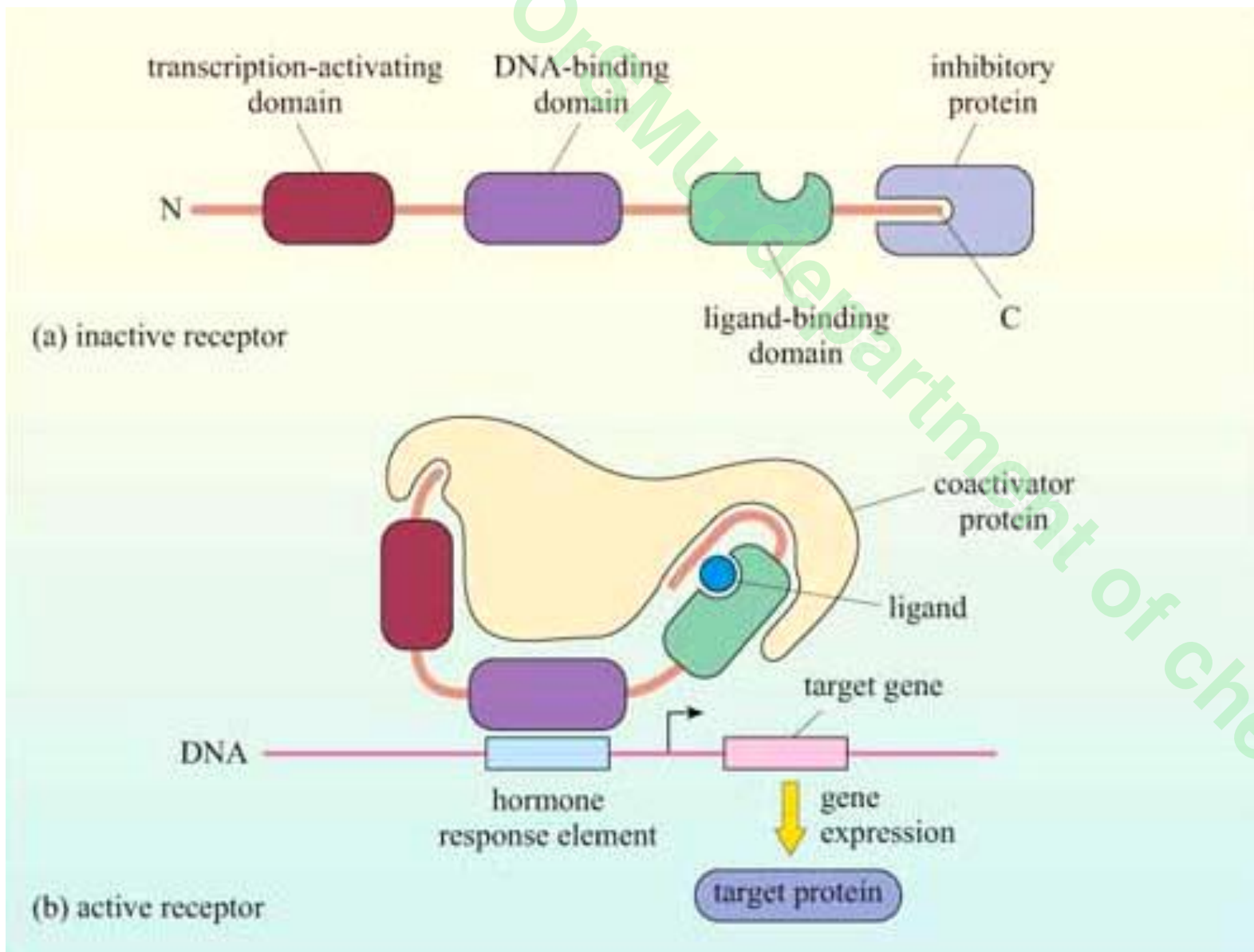
Строение рецептора:

- **домен** для распознавания и связывания лиганда
- ДНК-связывающий **домен**
- **домен** активации транскрипции

В отсутствии лигандов, рецепторы находятся в неактивной конформации (поддерживается с помощью **ингибирующих белков – шаперонов/Hsp**). Связывание лиганда индуцирует активную конформацию рецептора, что сопровождается диссоциацией ингибирующего белка. Активированный лиганд-рецепторный комплекс диффундирует в ядро где связываться с участком ДНК посредством своего ДНК-связывающего домена. Помимо этого, лиганд-рецепторный комплекс способен связываться с другими белками: белками-коактиваторами транскрипции.

Участок ДНК, с которым связывается комплекс лиганд-рецептор, является промотор-регионом таргетного гена и называется **гормон-респонсивным элементом (hormone response element (HRE))**.

Внутриклеточный рецептор и механизм его активации лигандом



В отсутствии лигандов, рецепторы находятся в неактивной конформации (поддерживается с помощью ингибирующих белков – шаперонов/Hsp). Связывание лиганда индуцирует активную конформацию рецептора, что сопровождается диссоциацией ингибирующего белка. Активированный лиганд-рецепторный комплекс диффундирует в ядро где связывается с участком ДНК посредством своего ДНК-связывающего домена. Помимо этого, лиганд-рецепторный комплекс способен связываться с другими белками: белками-коактиваторами транскрипции.

Вопросы к занятию № 5: «Молекулярные основы рецепции и внутриклеточной сигнализации»:

- Функции системы рецепции и внутриклеточной сигнализации. Общий обзор межклеточной и внутриклеточной систем передачи сигнала.
- Способы межклеточной сигнализации: эндокринная, паракринная, аутокринная, юстакринная, интракринная, транссигнализация, криптокринная.
- Определение понятий рецептор, лиганд. Обратимость связывания рецептор-лиганд. Изменение конформации рецептора в ответ на связывание лиганда. Сродство и специфичность лиганд-рецепторных взаимодействий.
- Принципы классификации поверхностных рецепторов. Функциональное разделение на ионотропные и метаботропные, структурно-функциональное разделение на основные типы: ионные каналы; семидоменные рецепторы, сопряженные с тримерными G-белками; однодоменные рецепторные тирозинкиназы и схожие с ними рецепторы;
- Внутриклеточные рецепторы как лиганд-управляемые транскрипционные факторы. Гормон-чувствительные элементы, лиганд-связывающие домены внутриклеточных рецепторов.
- Общая схема рецепции и внутриклеточной сигнализации. Первичные и вторичные мессенджеры.
- Классификация сигнальных молекул по скорости клеточного ответа, вызываемого ими: нейромедиаторы; гормоны, активирующие мембранные рецепторы; гормоны, активирующие внутриклеточные рецепторы.
- Определение понятий рецептор, лиганд, внутриклеточная сигнализация, агонисты, антагонисты, вторичные посредники
- Зависимость скорости прохождения гормонального сигнала от константы диссоциации лиганда и рецептора.

OrSMU, department of chemistry

Спасибо за внимание!